

CONTENTS

DOJIN NEWS
ドージンニュース

2004
ISSN0385-1516
No.112

目次

製品案内

容量、価格は下記ページをご覧ください。









テクノ・リサーチパークの秋景色

WST-1 を用いたスーパーオキシドアニオンの検出とその応用
Detection of Superoxide Anion with WST-1 and its Application



受田　浩之
(Hiroyuki Ukeda)
高知大学農学部生物資源学科

[Summary]
Superoxide anion (O_2^-) is formed by one electron-reduction of molecular oxygen. It is a precursor of highly toxic hydroxyl radical and has a high reactivity with nitric oxide to form peroxynitrite. The detection of unstable O_2^- is generally based on indirect method using a probe which can trap O_2^- to result in any chemical change. There are several kinds of probes for O_2^- such as colorimetric, spin trapping, fluorimetric and chemiluminometric probe. Among them, colorimetric probe is the most convenient one because of no need for special instrument. Instead of its convenience, the conventional colorimetric probes such as cytochrome c and NBT has a drawback in the selectivity. In order to overcome the problem, we examined some water-soluble tetrazolium salts which have been recently synthesized and found that WST-1 shows a satisfactory property as colorimetric probe because of the reactivity with O_2^- and the selectivity.

In the present article, I describe the reaction mechanism of WST-1 with O_2^- and application of WST-1 to detect O_2^- derived from biochemical materials such as animal homogenates, microalgae and yeast and to estimate the scavenging activity of O_2^- which the enzyme superoxide dismutase and some bioresources including food components have.

キーワード：スーパーオキシドアニオン、WST-1、SOD、抗酸化能

1．はじめに

好気性生物は生体エネルギーであるATPの生産に、また細胞成分合成のためのオキシダーゼ、オキシゲナーゼの基質として酸素を必要とする。ヒトの場合、1 日に約 500 ℓ の酸素を吸収し、約 70 kg の ATP を生産すると見積もられている[1)]。当然、この役割において、酸素の必須性に異論を唱える余地は無い。ところが、生命にとって必須の酸素が、高濃度になると毒として作用することが最近になってわかってきた。例えばマウスを、95%以上の酸素雰囲気下で飼育すると、5日以内に死に絶えてしまう[2)]。ではなぜ、酸素はこのように“諸刃の剣”として振舞うのであろうか。体内に取り込まれた酸素は 4 電子還元されて水になる。しかしながらその途中で、生体分子に対して大きなインパクトを与える活性酸素種が生成する（式 1）。

$$O_2 \xrightarrow{e^-} O_2^- \xrightarrow{e^-} H_2O_2 \xrightarrow{e^-} OH\cdot \xrightarrow{e^-} H_2O \qquad (1)$$

このうち不対電子を有するスーパーオキシドアニオン（O_2^-）とヒドロキシルラジカル(OH・)は寿命が短く（平均寿命：O_2^- は 5s、OH・は 200 μs）[3)]、反応性が高い。特に、OH・は活性酸素種の中でも最も高い反応性を有しており、生体内の様々な物質とほとんど拡散律速で反応する。O_2^-はOH・と比べれば反応性は低いが、OH・の前駆体であると共に、一酸化窒素(NO)と反応して、NO の持つ生理作用（血管弛緩作用など）を消失させる。従って生体内で、大量のO_2^-やOH・が生成する環境が整えば、生体は恒常性を維持することが困難になり、ヒトの場合、様々な病気を発症することとなる。つまり酸素の毒性は、酸素の還元で生成する活性酸素種の仕業であると言える。

本稿では、好気性生物の生命現象に深く関わる活性酸素種のうち、特に酸素の 1 電子還元で生じる O_2^- に注目し、その検出法の概略を述べた後、最近開発された簡易な発色検出法（WST-1 法）について紹介する。さらにその検出法の様々な分野における応用について、最近の著者の研究を中心に解説していきたい。

2．O_2^-の検出法

短寿命で、かつ分光学的な特徴に乏しい O_2^- を直接的に検出することは難しい。そこで、短寿命の O_2^- を種々のプローブと呼ばれる化合物と反応させ、より長寿命で検出しやすい化学種に変換する間接法が一般的に用いられる。

そのうち、O_2^-との反応で色の変化へと導く吸光光度法が最も簡便な方法として広く用いられている。この目的に汎用されている発色プローブはシトクロム c とニトロブルーテトラゾリウム塩(NBT)である[4)]。シトクロム c 還元法による O_2^- の検出は、酸化型シトクロムが O_2^- によって還元されると 550 nm に強い吸収をもつ還元型に変わることを利用した方法である（モル吸光係数2.1×10^4 $M^{-1}cm^{-1}$）。しかしながらシトクロムcはO_2^-以外にNADPHレダクターゼなどの還元酵素や様々な還元性物質によって還元される。さらにシアン化物イオンもシトクロム c との反応性を有する[5)]。一方、NBT 還元法は NBT が O_2^- により還元され、水不溶性のブルーホルマザン（吸収極大 560 nm）を生じることを利用し

たものである（モル吸光係数2.54×10⁴ M⁻¹cm⁻¹）。水不溶性であることから、長時間の分析では不均一な分散が生じてしまう。また、NBTはキサンチンオキシダーゼ（XO）やグルコースオキシダーゼなどの酸化酵素の還元型中間体と直接的に反応することから[6]、シトクロムcと同様に選択性に問題がある。

これに対して、スピントラップ剤を用いた電子スピン共鳴（ESR）法は特異性の高い方法である。O_2^-のシグナルを室温において溶液中で直接的に観測することはできないが、スピントラップ法を用いることで間接的に測定可能である。現在用いられている汎用性の高いスピントラップ剤は5,5-ジメチル-1-ピロリン *N*-オキシド(DMPO)である。O_2^-を捕捉したDMPOは特徴的なESRスペクトルを示すので、従来法の中でESR法は最も特異性の高い方法と言える。DMPOのO_2^-付加体は半減期が約50秒で、寿命の短いO_2^-を安定に分析できる。しかしながらESR法は測定に比較的大型の装置を必要とすることから、簡便性に欠ける。

最近、ヒドロエチジンを用いたO_2^-の蛍光検出法が開発されている[7]。ヒドロエチジンはO_2^-によって蛍光性のエチジウムに酸化されると考えられていたが、実際の生成物はHPLCでエチジウムと異なる保持時間を有することが明らかにされた。生成物の構造に関して詳細は明らかではないが、その生成物はO_2^-との反応で特異的に生じることが証明されており、本原理によりO_2^-の特異的な蛍光検出が可能となる。

上記吸光光度法（シトクロムc）、ESR法（DMPO）と蛍光法を表皮細胞の発生するO_2^-の検出に対して比較したところ、それらの間に大きな検出感度の差は認められなかった[8]。これらの方法に対して、化学発光プローブを用いる化学発光法は、一般的に、より高感度なO_2^-の検出が可能である。プローブとして汎用されているのはウミホタルルシフェリン類縁体（MCLA）とルシゲニンである。但しルシゲニンは表皮細胞にNADHやNADPHなどの電子供与体が共存している系では、O_2^-を2次的に発生させ、正の誤差を与える。一方、MCLAはO_2^-だけでなく一重項酸素とも反応性があること、溶存酸素と反応してバックグラウンド発光を示すこと、さらに遷移金属イオンにより酸化反応が促進されることなど、取り扱いには細心の注意を要する。

3．WST-1とO_2^-との反応

上述のように様々な方法がO_2^-の検出法として報告されているが、ハードの簡便さ、O_2^-に対する特異性、検出感度の高さのすべての面で満足のいく方法は確立されていない。装置的には吸光光度法が最も簡便性が高いため、著者らは発色プローブとしてO_2^-に対する特異性の高い試薬をスクリーニングすることにした。その結果、1993年から97年にかけてIshiyamaらが合成した水溶性テトラゾリウム塩[9]がO_2^-に対する高い反応性と優れた特異性を有していることを明らかにした[4]。現在、そのうちWST-1（Fig.1）が広くO_2^-の発色プローブとして利用されている。WST-1は水に対して数十mMオーダーの溶解性を有するテトラゾリウム塩である。酸化型は無色であるが、還元を受けると438 nmに極大吸収が現われ、特徴的な黄色を呈する（モル吸光係数1.1×10⁴ M⁻¹cm⁻¹）。従来の発色プローブであるNBTはその欠点として、XOやグルコースオキシダーゼの還元型中間体と反応して、ホルマザンを生成するが、WST-1はこれらの酵素の中間体とは相互作用しない[10]。したがってNBTよりもO_2^-の検出に適した発色プローブである。

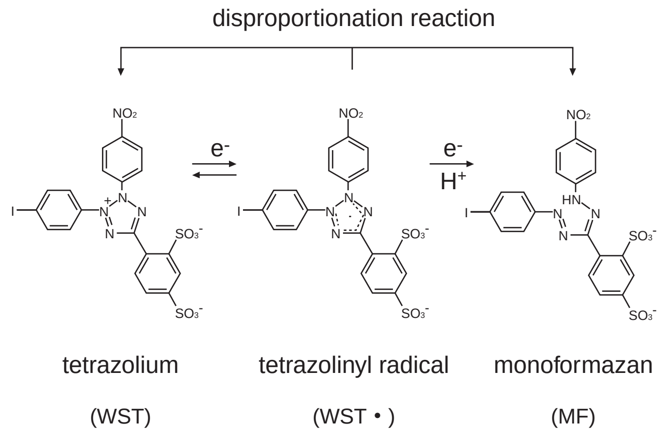


Fig. 1 Reduction mechanism of tetrazolium salt WST-1.

Oritaniらは WSTとO_2^-の反応を詳細に解析している[11]。サイクリックボルタンメトリーによる電気化学的な酸化還元挙動の解析から、WSTは2段階で還元されることが示されている(Fig. 1)。1段階目の還元は1電子還元反応で、テトラゾリニルラジカルを生成する。本反応の還元電位は-0.20 V（対銀－塩化銀電極）で、この反応はpHに依存しない。2段階目の還元電位は-0.47 V（対銀－塩化銀電極）で、生成物としてホルマザンを与える。この2段階目の反応はpHに対する依存性が強い。第1段階の還元電位がO_2/O_2^-の酸化還元対の式量電位よりも正なので、熱力学的に見ても WSTはO_2^-によって還元される。

WSTとO_2^-の反応は次の（2）式に従い進行する。WST-1の酸化還元挙動からこの反応は次の2つの素反応（3）と（4）から成ると考えられる。このうち（4）の反応は水中では極めて迅速に進行し、

$$2O_2^- + WST \xrightarrow{H^+} 2O_2 + MF \quad (2)$$

$$O_2^- + WST \xrightarrow{k_1} O_2 + WST\cdot \quad (3)$$

$$2WST\cdot \xrightarrow{k_2} WST^+ + MF \quad (4)$$

全体の反応の律速段階は（3）の反応である。ストップトフロー法で詳細に解析された（3）の2次反応速度は3～4×10⁴のオーダーである。なお（3）の反応は酸素濃度に依存しないことから、逆反応、すなわちWSTラジカルから新たにO_2^-が生じる反応は起こらないと考えられる。本反応速度は従来のNBT（6～7×10⁴ M⁻¹s⁻¹）と比べると若干小さいが、オーダー的には差はない。またホルマザンのモル吸光係数としてはNBTの1/2～1/3の程度であるが、モノテトラゾリウムとしての性質、水に対する溶解性などから考えて、WST-1はNBTよりもO_2^-の発色プローブとして優れていると言える。

4．O_2^-の検出

4-1　生体試料の発生するO_2^-の検出

WST-1のO_2^-検出能を、種々の生体試料に応用した例がこれまでにいくつか報告されている。Tanらは、刺激を与えた好中球の生産するO_2^-の検出にWST-1を適用し、従来法であるフェリシトクロムc法と比べてWST-1法は、バックグラウンドが低く、吸光度の変化率が高いこと（約2倍）、またO_2^-を特異的に消去し得る酵素スーパーオキシドジスムターゼ（SOD）を共存させた際のホルマザンの生成がほとんど完全に抑制される（98%、フェリシトクロムcでは88%）ことから、O_2^-に対する特異性が高いことを明らかにしている[12]。

免疫細胞と同様に、海洋の赤潮プランクトンの中にもO_2^-を細胞外に放出するものが報告されている。著者らは、*Chattonella antiqua*、*Chattonella marina*、*Heterosigma akashiwo*、*Skeletonema costatum*、*Gymnodinium mikimotoi*について、WST-1によるO_2^-の検出を試みると共に、本法の赤潮プランクトン細胞数計測への応用について検討した[13]。はじめに、培地へのWST-1の添加がプランクトンの生育に与える影響を調べたところ、添加の有無で、すべてのプランクトンの生育に差は認められなかった。次に、プランクトンが増殖したWST-1添加培地の可視吸収スペクトルを測定したところ、*Chattonella*属、及び*H. akashiwo*の培養液で増殖に伴い、WST-1ホルマザンに特徴的な438 nmの吸収極大が出現した。さらにこの吸収の増大は、培地にSODを添加することで有意に減少することも明らかとなった。これらの3種類のプランクトンはO_2^-を生産することがこれまでに他の方法で確認されていることから、WST-1は赤潮プランクトンの生産するO_2^-を検出できることが示唆された。今後、赤潮プランクトンの生態解明に対して、本法の利用価値は高いと考えられる。また検出感度をさらに向上させることができれば、フィールドにおける赤潮プランクトンの検出にも適用できると期待される。

一方、Tsukataniらは酵母を2,3,5,6-テトラメチル-1,4-ベンゾキノンと共存させた後(pH 7.0)、そのpHを9.8に上げると、酵母の呼吸活性によって生成していたセミキノンラジカルの自動酸化に伴い、O_2^-が生成することをESRを用いて証明している[14]。ここにWST-1を共存させると、そのO_2^-検出能によって、間接的に酵母の呼吸活性を測定できる。この呼吸活性は当然、酵母の生細胞数と正の相関があり、WST-1の吸光度変化により、1.0×10^5から2.0×10^7細胞/mlの細胞数測定が可能である。酵母が直接O_2^-を生成するわけではないが、酵母の呼吸活性によって二次的に生成したO_2^-を間接的に捉える方法であることから、本法はO_2^-の検出を応用した新しい細胞計測技術と言える。

4-2　メイラード反応で生じるO_2^-の検出

O_2^-の生成は様々な酵素反応で認められる。しかしながら、生体内では、酵素に依存しない化学反応でO_2^-が生成する場合がある。その典型的な例が、タンパク質のアミノ基と糖のカルボニル基との間で起こるメイラード反応である[15]。酵素がメイラード反応を受けると触媒活性にかかわる官能基が化学修飾され、その活性が低下する。またメイラード反応生成物が細胞のアポトーシスを誘導することもある[16]。さらに反応と同時に生成するO_2^-をはじめとする活性酸素種が、生体内の酸化ストレスを亢進させている。著者らはメイラード反応で生じるO_2^-のモニタリングにWST-1を適用した[17,18]。各種カルボニル化合物をN^α-アセチルリジンと37℃で2日間反応させ、試料とした。この溶液0.4 mlに2 mM WST-1を含むリン酸塩緩衝液1.0 mlを添加し、10分毎に438 nmの吸光度を測定すると、カルボニル化合物の種類、濃度に依存してホルマザンの生成に伴う吸光度の増加が認められた。その吸光度の増加は、反応液にSOD、あるいは同様にO_2^-の消去能を有するTironを共存させると86～100%阻害されたので、ほとんどがメイラード反応に伴って生成したO_2^-に依存していることが示唆された（Fig. 2）。同様の実験をシトクロムcで行ったところ、シトクロムcの吸収はSODやTironの共存で、21～40%しか阻害さ

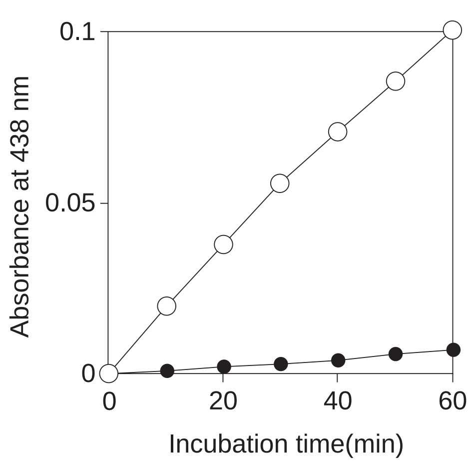


Fig. 2 Absorbance change by WST-1 assay. Glyceraldehyde (5 mM), N^α-acetyl-*L*-lysine (10 mM) and DTPA (50 μM) in 50 mM chelex-treated phosphate buffer (pH 7.0) were incubated for 2 days at 37℃. The assay was performed in the absence (○) and presence (●) of SOD.

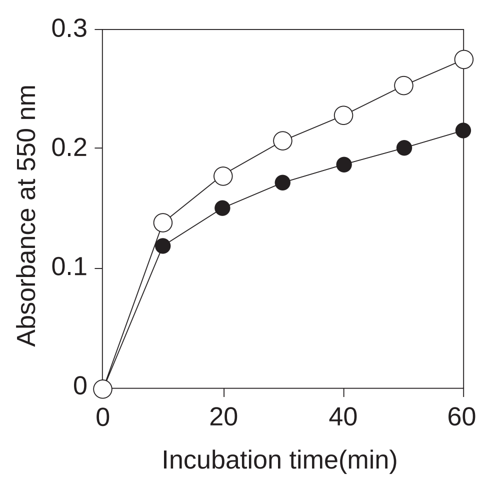


Fig. 3 Absorbance change by cytochrome *c* assay. Glyceraldehyde (5 mM), N^α-acetyl-*L*-lysine (10 mM) and DTPA (50 μM) in 50 mM chelex-treated phosphate buffer (pH 7.0) were incubated for 2 days at 37℃. The assay was performed in the absence (○) and presence (●) of SOD.

Table. 1
Superoxide Anion Generated by Various Carbohydrates with and without 10 mM *N*α-acetyl-*L*-lysine(N-Ac-Lys)

Carbo hydrate (5.0 mM)	Superoxide anion formation(nmole/ml/h)			
	WST-1 method		Cytochrome c method	
	+N-Ac-Lys	Aldehyde alone	+N-Ac-Lys	Aldehyde alone
Glyceraldehyde	19.1	8.51	10.7	5.36
Glycolaldehyde	8.70	1.43	7.12	4.28
Threose	39.1	4.46	13.4	0.713
Erythrose	48.0	16.2	13.8	4.84
Xylose	1.61	0.203	0.356	nd*

*nd means “not detected”.

れなかったことから（Fig. 3）、メイラード反応系の O_2^- の検出においても、WST-1がシトクロムcよりも優れた検出プローブであることが明示された。次にメイラード反応系に直接WST-1を共存させて O_2^- の検出を試みた。反応の経過に伴い、438 nm の吸収が増大したが、Tiron の共存系では85%まで、その吸光度変化が抑えられ、共存系でも WST-1 は O_2^- に対して高い特異性を示すことが明らかとなり、リアルタイムでの O_2^- のモニターが可能であることが明らかとなった。カルボニル化合物はそれ自体でも自動酸化に伴い O_2^- を生成することが報告されているが、同様に WST-1はカルボニル化合物単独での O_2^- の生成も検出できる。シトクロム c 法との比較から、トレオースやエリスロースなどの関与するメイラード反応では、従来考えられていたよりも3倍〜4倍の O_2^- が生産されていることが明らかとなった（Table 1）。

4-3 O_2^- の検出に基づく酵素アッセイ

酸化酵素の中には、XOのように反応に伴い、O_2^- を生成するものがある。WST-1は O_2^- を簡便に検出できることから、著者らはその反応を指示反応として利用すれば、簡易でかつ高感度な新しいタイプの酵素分析法を構築できると考えた。そこで、まずモデル系として、代表的な O_2^- 生成酵素である XO を用いたヒポキサンチンの新しい検出システムを試作した[19]。WST-1と酸素濃度を一定にして、ヒポキサンチン濃度に依存した O_2^- の生成と、それに伴う WST-1 ホルマザンの生成を 438 nm の吸光度変化からモニターする(Fig. 4)。測定にはフローインジェクション分析（FIA）法を用いた。本システムでは臭化シアン活性化Sepharose にXOとカタラーゼ（XO の安定性を向上させるため）を同時に固定化し、カラムに充填してリアクターとした。試料（ヒポキサンチン）は WST-1 溶液と予め 9 対 1 の比率で混合し、キャリヤー溶液中に注入した。標準のヒポキサンチン溶液に対する応答を指標にキャリヤー溶液中のpHと流量、並びに試料と共に注入するWST-1 濃度の最適化を行い、それぞれ 10.2、0.4 ml/min、並びに 20 mMに設定した。本条件では、2.5 μM〜1.0 mM の範囲でピーク高とヒポキサンチン濃度との間に直線関係が認められた。繰り返し測定の結果得られた変動係数は1%以下（0.5 mM; n=10）であり、1 時間当たり 30 検体の分析が可能であった。魚肉のヒポキサンチン含量をHPLC 法と比較した結果、両者の間には良好な直線的相関（r=0.9994; n=16）が認められた(Fig. 5)。酵素リアクターは 500 回の繰り返し測定、並びに 5℃での 3ヶ月間の保存後も活性の低下傾向を示さなかった。

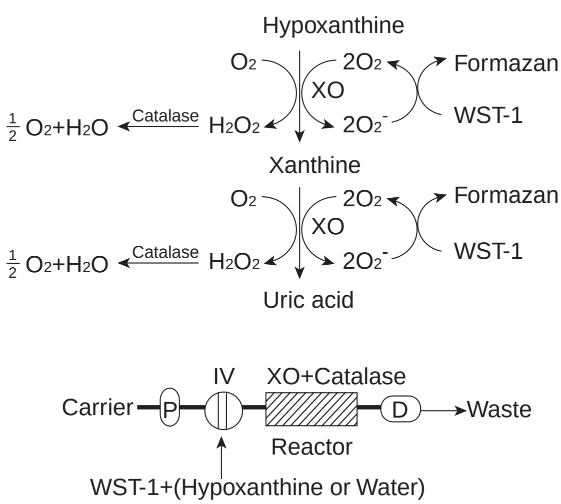


Fig. 4 Principle and FIA manifold of hypoxanthine assay. P, pump; IV, injection valve; D, detector.

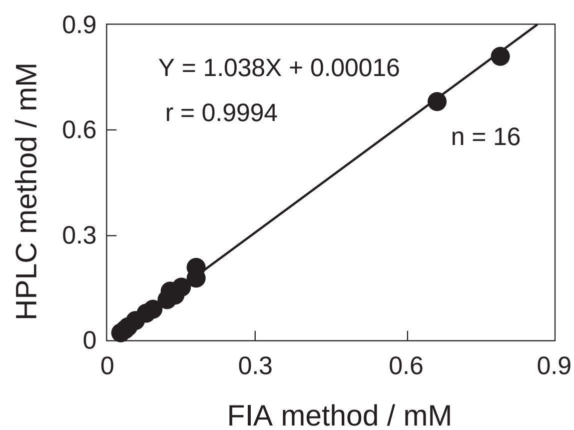


Fig. 5 Correlation between the conventional HPLC method and the FIA method for the determination of hypoxanthine in fish samples. X and Y indicate the concentration (mM) obtained by the present FIA method and the HPLC method, respectively.

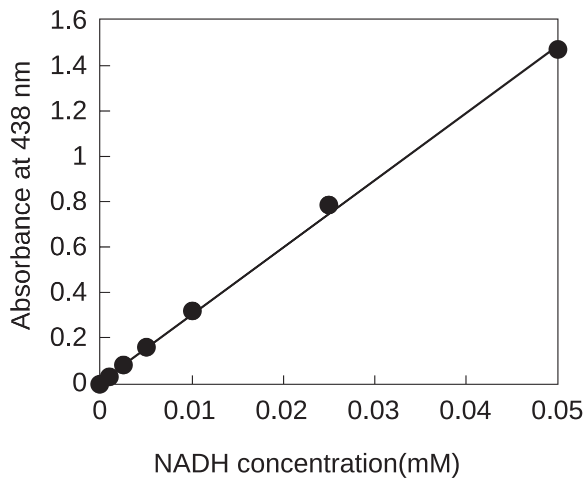


Fig. 6 Calibration curve of NADH based on the detection of O_2^- formed in the oxidation of NADH.

次に補酵素NADHの酸化を触媒するNADHオキシダーゼ（NOD）をO_2^-生成酵素として利用することとした[20)]。この目的のために*Bacillus licheniformis*由来のNODを用いた。本酵素反応では、NADHの酸化に伴い、WST-1ホルマザンが生成した。さらにその生成が酸素濃度に依存し、SOD及びTironの添加で阻害されたことから、ホルマザンの生成にO_2^-が関与していることが明らかとなった。最適pHである9.0でNADHの定量性を調べたところ、終濃度0.5～50 μMの範囲で、NADH濃度と438 nmの吸光度の間に直線関係が認められた(Fig. 6)。さらに本反応を指示反応とすれば、各種脱水素酵素反応と共役させることで、その基質の定量法を構築することができる。例として、アルコール脱水素酵素（ADH）と組み合わせたエタノールの定量系を検討した(Fig. 7)。最適反応条件におけるエタノールの定量範囲は0.067～16.8 μMで、各種アルコール飲料（ビール、焼酎、日本酒、ウイスキー）について本反応系を適用したところ、得られた分析結果は、市販の酵素分析法であるF-Kit法の分析結果と良好に一致することが明らかになった。今後、NODを指示反応として、様々な脱水素酵素の基質定量系を構築していきたいと考えている。

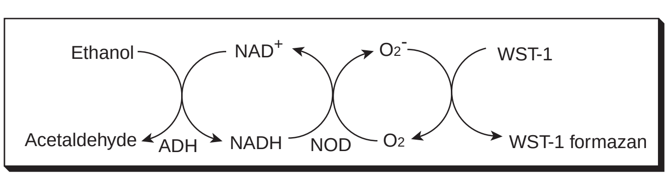


Fig. 7 Reaction mechanism of ethanol analysis. ADH, alcohol dehydrogenase; NOD, NADH oxidase.

5．O_2^-消去活性の測定

5-1　測定原理

上述のようにWST-1は簡便で比較的特異性の高いO_2^-の検出プローブである。この性質を利用すれば、WST-1をO_2^-の消去活性の測定にも利用できる。生物はO_2^-の毒性から身を守るために、O_2^-の反応性を低下させる様々な防御系を備えている。その最も代表的なものが酵素SODである[21)]。本酵素はO_2^-を酸素と過酸化水素に不均化する反応を触媒する（式5）。酸化ストレスに対する第一防御ラインを担う重要な抗酸化酵素の一つであるが、

$$2O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2 \qquad (5)$$

さらに生物の寿命を決定する因子であることがCutlerらによって指摘され、その活性に関する知見が様々な生命現象の解明に重要な意義を有すると考えられている。

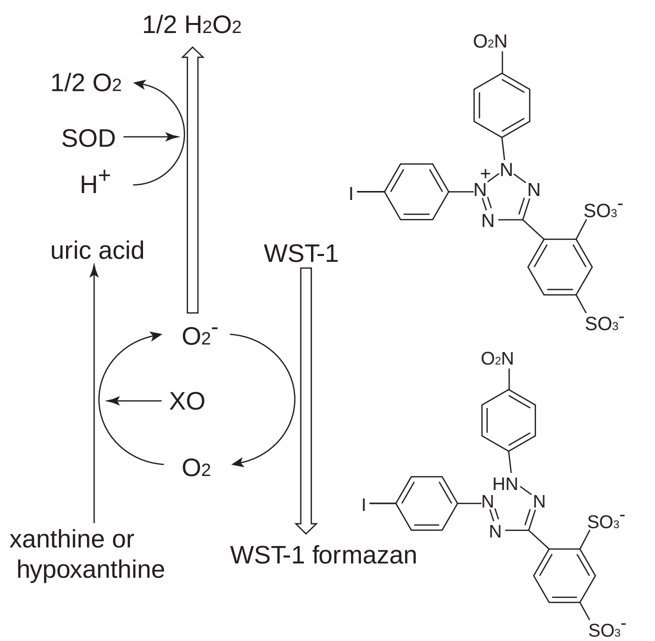


Fig. 8 Principle of the WST-1 method for estimation of SOD and superoxide anion-scavenging activity (SOSA).

WST-1を用いたSODの活性測定法の原理をFig. 8に示す[10)]。SODの基質となるO_2^-の発生には、酵素XOによるキサンチンの酸化反応が利用される。反応溶液には生成したO_2^-を検出するためにWST-1を共存させておく。試料を添加していないときのWST-1の色の変化（ホルマザンの生成量）をコントロールとして、各試料を添加した際のホルマザン生成の抑制率をその試料が示す阻害率として表現する。通常、各試料が50%の阻害を示す濃度（IC_{50}）を各試料の活性評価に利用する。一方、本活性測定法において発生したO_2^-は自発的な不均化反応で酸素と過酸化水素に変化している。この自発的な不均化反応は酸性領域で速く、生理的pH付近（7～8）での速度は8.5×10^5～8.5×10^4 $M^{-1}s^{-1}$である。したがってSOD測定は一般にアルカリ領域（例えばpH 10.2）

が好んで使われる。最適化されたアッセイ条件で得られたSODの阻害曲線をFig.9に示す。前述のようにWST-1はXOの還元型と相互作用しないことから、SODの阻害曲線が100%に到達する。またIC_{50}を示すSOD濃度がアッセイpHに大きく依存せず、一定の値を示す。これらの特徴から本WST-1法は、従来のテトラゾリウム塩を用いたSOD活性評価法の問題点を完全に克服した理想的な方法であると言える。現在、本測定原理に基づいて、マイクロプレートでの多検体測定を可能としたSOD Assay Kit-WSTが同仁化学研究所から市販されるに至っている。本測定キットを用いてSOD標品のIC_{50}を求めると2.0 units/ml以下である。この濃度から考えて、本測定キットは標準SODに対してESR法の2倍以上の検出能を有する。

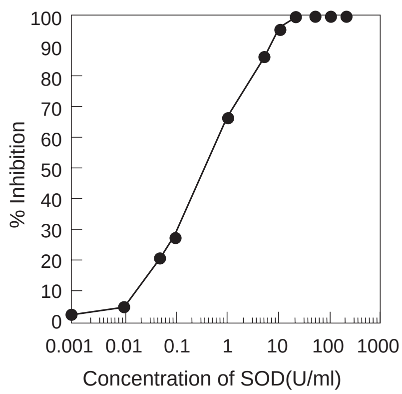


Fig. 9 Inhibition curve of standard SOD preparation by the WST-1 method.

5-2　SOD活性測定への応用

WST-1法に基づいたSODアッセイは様々な生体試料のSOD活性測定に利用されている。最近の論文からいくつかの例を紹介する。SakudoらはSOD活性に与えるプリオンタンパク質の影響を調べるために、マウスの脳、及び睾丸の細胞ホモジネートのSOD活性を本WST-1法によって測定した[22]。またHakkinenらは魚（カマス）稚魚に対する紫外線（UV-B）毒性を調べるために、そのホモジネートのSOD活性をWST-1法を用いて測定している[23]。一方、生物におけるMn-SODの意義を考える上で興味深い研究が本法を用いて展開されている。従来、Mn-SODは生命活動を維持する上で必須と考えられていたが、Ikegamiらは最近、臓器特異的にMn-SODを欠損したモデルマウスを作製し、肝臓のMn-SODがマウスの生命活動に必須ではないことを明らかにしている[24]。彼らはそのモデルマウスの肝臓がMn-SODを欠損していることを、WST-1法を用いて証明した。植物に関してもいくつかの報告がある。一つは、異なる栽培条件で得られたトマト、ナスの根のホモジネートが有するSOD活性を測定した例である[25]。もう一つは、Germinと呼ばれる熱安定性のタンパク質のキャラクタリゼーションに関する研究である[26]。Germinはコムギの発芽時に特異的に発現するタンパク質で、過酸化水素を生成するシュウ酸酸化酵素である。WooらはこのGerminがMnを保持し、SOD活性を有することを、WST-1法を用いて明らかにしている。この結果から、かれらはGerminが細胞外で発生したO_2^-の消去作用を担っていることを示唆している。一方、ShimasakiらはWST-1法を用いて、未変性状態のSODを等電点ゲル電気泳動で分離し、ゲルごとWST-1とインキュベートすることで、その活性を測定できることを示している[27]。彼らはこの方法で、ほとんど活性のロス無くSODを回収できることを報告している。

5-3　O_2^-消去活性評価への応用

SODはO_2^-を不均化して、その毒性を低減するが、天然には不均化とは異なる機構でO_2^-の反応性を低下させるいわゆる抗酸化物質が存在している。例えば、アスコルビン酸はO_2^-の不対電子を捕捉して、自らはモノデヒドロアスコルビン酸へと変化する。さらにその2分子が不均化してアスコルビン酸とデヒドロアスコルビン酸に変わる。このようなラジカルの捕捉活性もSODの活性測定と同じ原理で評価できる。このようなO_2^-の反応性を低下させる作用をO_2^-消去活性(superoxide anion-scavenging activity: SOSA)と呼ぶ。

現在、SOSAを有する食品成分は老化や各種生活習慣病の予防に対して重要な意義を持つと考えられている[28]。そのような活性を示す食品成分として、野菜などの植物素材に含まれるアスコルビン酸やフラボノイド、ワインやお茶に含まれるポリフェノール類を挙げることができるが、カゼイン[29]や魚肉タンパク質[30]由来のペプチドからもその活性が確認されている。今後、様々な食品、及び生物素材から新しいSOSA物質が発見される可能性も高く、機能性食品素材や医薬資源の開発分野で大きな注目を集めている。

そこで著者らはWST-1法を食品の有するSOSA評価に適用してみることにした。最初に試料として、これまでの研究でSOSAを示すことが明らかにされている各種嗜好性飲料を用いることにした[31]。それらの試料には様々な還元性物質が含まれていることから、O_2^-が介在することなく、各試料が直接WST-1を還元する程度を、XO溶液の代わりに緩衝液を添加することで測定した。予想通り、希釈していない各種嗜好性飲料をWST-1と共存させると、O_2^-の関与しない食品試料による直接的なWST-1の還元が起こることが観察された。この非特異的な妨害反応を抑えるために、各試料の複数の希釈系列を調製してWST-1に対する非特異的な還元の程度を調べた。コントロールの吸光度変化に対して、妨害物質であるWST-1還元性物質に由来する吸光度変化が10%以下であればその妨害が無視できるレベルであると考えると、その希釈倍率は赤ワインで20倍、緑茶で100倍、ココアで30倍、インスタントコーヒーで30倍であった。次にSOD Assay Kit-WSTを用いて各食品のSOSAを測定した（Fig. 10）。各試料が50%阻害を示すときの希釈倍率は、赤ワインで180〜230倍、緑茶で3000倍、ココアで230倍、インスタントコーヒーで210倍であった。これらの希釈倍率では各試料で認められたWST-1還元性物質の影響はコントロールの吸光度変化の3%以下であり、その妨害は全く問題にならないことが判明した。SOD標品のIC_{50}を基準にして求めた各食品試料のSOSAをTable. 2に示した。ESRで得られた値と比較して、WST-1で得られたSOSA値はワイン、緑茶では低く、インスタントコーヒーでは高い値を示した。またココアの値は両者の方法で良好に一致している。両者の方法が異なるアッセイpHで行われていることと、全く異なるO_2^-の検出プローブを用いていることを考え合わせると、ここで得られた両者の測定値間には比較的高い一致性があると考えられる。

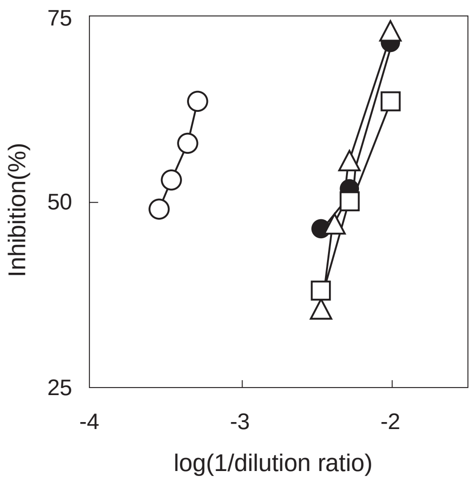


Fig. 10 Inhibition curves of some food samples obtained by the WST-1 method. The food samples were green tea (○), red wine (□), coffee (△) and cocoa (●).

Table. 2 Comparison of SOSA of some foods measured by WST-1 and ESR method

Sample		Method	
		ESR	WST-1
Red wine 1	(units/ml)	866	348
Red wine 2	(units/ml)	832	392
Red wine 3	(units/ml)	755	199
Green tea 1	(units/g)	67,100	38,500
Green tea 2	(units/g)	113,000	38,000
Coffee	(units/g)	31,800	57,400
Cocoa	(units/g)	5,420	5,480

次に本WST-1法を用いて、高知県産食品についてSOSAの測定を試みた[32]。用いた食品試料とそのエタノール抽出物が示したSOSAを合わせてTable. 3に示す。これらの抽出物に関して、同時にESR法でもSOSAを測定しWST-1法の結果と比較してみた。両者の測定結果の間には相関係数0.958の高い正の直線的相関が認められた。このことは嗜好性飲料以外の様々な種類の食品に対して、本WST-1法がESR法と高い相関を与え、様々な食品素材のスクリーニングに対して本法が幅広い適用性を有していることを示す。測定結果に注目すると、2つの茶葉、すなわちギャバロン茶と碁石茶が極めて高い活性を示した。同様の条件で測定した緑茶よりもこれらの茶葉は高い活性を示したことから、今後これらの食品を付加価値の高い地域資源として育てていきたい考えている。

一方、SOD Assay Kit-WSTはマイクロプレートでの多検体同時分析が可能で、かつ測定に要する試料量が極めて少なくてすむ(20 μl)。従って、SOSAの活性成分を分画し、構造解析を進めていくには有用である。著者らは、この特徴を利用して、イワシすり身のプロテアーゼ加水分解物の有するSOSAを追跡し、各種クロマトグラフィーにより、活性成分の単離を試みている[33]。

他にも植物由来のアントシアニン[34]、並びにマイクロアルジェ由来のフィトケラチン[35]のSOSAがWST-1法を用いて測定されている。

6．おわりに

WST-1を用いた O_2^- の検出を基軸として、その多様な応用例を紹介してきた。WST-1はこれまでに開発された O_2^- の発色プローブとしては、最も選択性が高く、かつ簡便性の高い試薬である。その特徴が認められて、すでにSODの活性評価法としては、世界的な地位を築きつつある。今後は本WST-1法で得られた O_2^- の検

Table. 3 SOSA of food samples (extract with 80% ethanol) produced in Kochi Prefecture

Sample name		SOSA(units/g dry)	
Japanese name	English name	ESR	WST-1
Gabaroncha	Anaerobically treated tea	390,000	94,000
Goishicha	Post-heating fermented tea	323,000	90,000
Kuwacha	Mulberry tea leaf	86,400	21,000
Shishitou	Small sweet green pepper	tr	tr
Ingenmame	Kidney bean	tr	tr
Shihoukuri	Chestnut	352	32,900
Okura	Okra	2,780	5,470
Derawea	Delaware	tr	tr
Kyuuri	Cucumber	tr	tr
Minitomato	Cherry tomato	tr	tr
Kansouaroe	Dehydrated aloe perrye	tr	tr
Biwa kaniku	Loquat(pulp)	297	tr
Biwa kahi	Loquat(peel)	1,470	1,460
Biwa syushi	Loquat(seed)	2,580	3,860
Sumomo kaniku	Plum(pulp)	811	1,610
Sumomo kahi	Plum(peel)	3,110	13,500
Sumomo syushi	Plum(seed)	36,000	22,100

tr:IC_{50} could not be determined under these conditions.

出やSOSA測定の成果が新たな生命現象の発見や、新しい機能性食品の創製に貢献していくことを期待したい。

参考文献

1) 今田伊助、佐藤英介、井上正康、化学と生物、**37**, 411 (1999).
2) 五味不二也、松尾光芳、老化と環境因子、松尾光芳編、pp. 113-127、学会出版センター、東京、1994.
3) 佐野浩亮、内海英雄、化学と生物、**37**, 328 (1999).
4) 受田浩之、*Dojin News*, **96**, 1 (2000).
5) A. Okado-Matsumoto and I. Fridovich, *Anal. Biochem.*, **298**, 337 (2001).
6) H. Ukeda, S. Maeda, T. Ishii and M. Sawamura, *Anal. Biochem.*, **251**, 206 (1997).
7) H. Zhao, S. Kalivendi, H. Zhang, J. Joseph, K. Nithipatikom, J, Vasquez-Vivar and B. Kalyanaraman, *Free Rad. Biol. Med.*, **34**, 1359 (2003).
8) M. A. Barbacanne, J. P. Souchard, B. Darblade, J. P. Iliou, F. Nepveu, B. Pipy, F. Bayard and J. F. Arnal, *Free Rad. Biol. Med.*, **29**, 388 (2000).
9) 石山宗孝、*Dojin News*, **82**, 10 (1996).
10) H. Ukeda, D. Kawana, S. Maeda and M. Sawamura, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **63**, 485 (1999).
11) T. Oritani, N. Fukuhara, T. Okajima, F. Kitamura and T. Ohsaka, *Inorg. Chim. Acta*, **357**, 436 (2004).
12) A. S. Tan and M. V. Berridge, *J. Immunol. Methods*, **238**, 59 (2000).
13) 受田浩之、坪内美樹、深見公雄、沢村正義、投稿準備中 .
14) T. Tsukatani, T. Oba, H. Ukeda and K. Matsumoto, *Anal. Sci.*, **19**, 659 (2003).
15) H. Ukeda, Y. Hasegawa, Y. Harada and M. Sawamura, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **66**, 36 (2002).
16) H. Sekido, T. Suzuki, T. Jomori, M. Takeuchi, C. Yabe-Nishimura and S. Yagihashi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **320**, 241 (2004).
17) H. Ukeda, T. Shimamura, M. Tsubouchi, Y. Harada, Y. Nakai and M. Sawamura, *Anal. Sci.*, **18**, 1151 (2002).
18) H. Iwata, H. Ukeda, T. Maruyama, T. Fujino and M. Sawamura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **321**, 700 (2004).
19) A. K. Sarker, H. Ukeda, D. Kawana and M. Sawamura, *Anal. Sci.*, **15**, 1141 (1999).
20) A. K. Sarker, H. Ukeda, D. Kawana and M. Sawamura, *Food Res. Int.*, **34**, 393 (2001).
21) 受田浩之、食品酵素化学の最新技術と応用-フードプロテオミクスへの展望-、井上國世監修、pp. 184-191, シーエムシー出版、東京、2004.
22) A. Sakudo, D. C. Lee, K. Saeki, Y. Nakamura, K. Inoue, Y. Matsumoto, S. Itohara and T. Onodera, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **308**, 660 (2003).
23) J. Hakkinen, E. Vehniainen and A. Oikari, *Aquatic Toxicol.*, **66**, 393 (2004).
24) T. Ikegami, Y. Suzuki, T. Shimizu, K. Isono, H. Koseki and T. Shirasawa, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **296**, 729 (2002).
25) K. H. R. Lin, C. C. Weng, H. F. Lo and J. T. Chen, *Plant Sci.*, **167**, 355 (2004).
26) E. J. Woo, J. M. Dunwell, P. W. Goodenough, A. C. Marvier and R. W. Pickersgill, *Nature Struc. Biol.*, **7**, 1036 (2000).
27) Y. Shimasaki, H. Ohnishi, S. Matsuura and T. Manaba, *Biochim. Biophys. Acta*, **1571**, 245 (2002).
28) T. Finkel and N. J. Holbrook, *Nature*, **408**, 239 (2000).
29) K. Suetsuna and H. Ukeda, *J. Nutr. Biochem.*, **11**, 128 (2000).
30) 末綱邦男、受田浩之、日水誌、**65**, 1096 (1999).
31) 受田浩之、森山洋憲、川名大介、片山泰幸、中林錦一、沢村正義、食科工、**49**, 25 (2002).
32) 森山洋憲、片山泰幸、中林錦一、受田浩之、沢村正義、食科工、**49**, 679 (2002).
33) 森山洋憲、片山泰幸、受田浩之、沢村正義、筬島克裕、松井利郎、松本清、食科工、**50**, 392 (2003).
34) 森山洋憲、森田善彦、受田浩之、沢村正義、寺原典彦、食科工、**50**, 499 (2003).
35) N. Tsuji, N. Hirayanagi, M. Okada, H. Miyasaka, K. Hirata, M.H. Zenk and K. Miyamoto, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **293**, 653 (2002).

著者紹介

氏　　名：受田　浩之 (Hiroyuki Ukeda)
所　　属：高知大学農学部生物資源科学科助教授
連 絡 先：〒783-8502　南国市物部乙200
Tel & Fax: 088-864-5189
E-mail：hukeda@cc.kochi-u.ac.jp
出身大学：九州大学大学院農学研究科
学　　位：農学博士
専　　門：食品化学、食品分析学、食品機能学
趣　　味：スポーツ（野球）

関連商品
SOD Assay Kit-WST

＜特長＞
- 100% SOD阻害率を測定することができる。
- ホルマザンの溶解操作が不要で、操作が簡単である。
- 一度に多検体の測定が可能である。

SOD Assay Kit-WSTは、高水溶性ホルマザンを生成するテトラゾリウム塩WST-1を使用しているため、ホルマザンの溶解操作は不要です。また、WST-1はxanthine oxidase(XO)と直接反応しないため、100% SOD阻害率を測定することができます。また96穴マイクロプレート対応なので、一度に多検体の測定が可能となっています。

品名	容量	本体価格（￥）	メーカーコード
SOD Assay Kit-WST	500 tests	19,000	S311

ライブセルイメージング技術講座 2

〜光の性質〜

浜松医科大学光量子医学研究センター
櫻井　孝司

（浜松医科大学・21 世紀 COE プログラム「メディカルホトニクス」の活動として掲載）

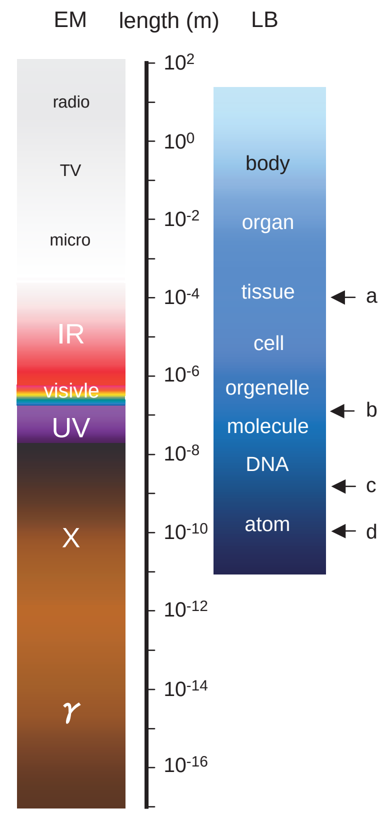


Fig. 1 Scales of electromagnetic wave (EM) and living bodies (LB). arrows; a theoritical limit of spatial resolution by a (human eye, 10^{-4} mm), b (optical microscopy, 10^{-7}mm), c (scanning probe microscopy or atomic force microscopy, 10^{-9} mm), and e (transmission electron microscopy, 10^{-10} mm)

1．はじめに

「細胞に光をあてる」ことでライブセルイメージングがはじまる。光と細胞の間で相互作用がおこり、「見えた映像」から細胞の状態や量を知ることができる。細胞の“見え”を良くするためにはどうしたらよいか？一番良い方法は、関心領域だけを非侵襲的に照明することであり、言い換えれば効率良く光を取り扱うことである。今回は「光を使いこなす」ために理解すべき基本的な光の性質や重要なキーワードについて、日常的な現象を例にしながら解説する。

2．光とは

2.1　波長による分類

光は電磁波（electromagnetic wave）の一種と考えられ（Helmholz, 1852 年)、波であり、粒子でもある。光の粒子は光子、又は光量子（photon）と呼ばれる素粒子で、電波と同じように電界と磁界の 2 つの成分で構成された横波となって進む。波の長さは波長（wavelength）と呼ばれ、電磁波は波長または周波数によって分類されている（Fig. 1)。波長の長いものから、ラジオやテレビの電波、リモコンや光ファイバインターネットなど通信に使われる赤外線（infrared, IR)、目に見える可視光線（visible light)、日焼けを起こす紫外線（ultraviolet, UV)、身体を透視するＸ線（X-ray)、高エネルギーのγ線（gamma-ray）などがある。可視光線の波長は細胞の大きさに近く、また生体への影響が比較的小さいとされているため、光学顕微鏡用の光源として汎用されている。一般に、波長が短いと顕微鏡の空間分解能が増し、波長が長いと生体機能へのダメージが減る。

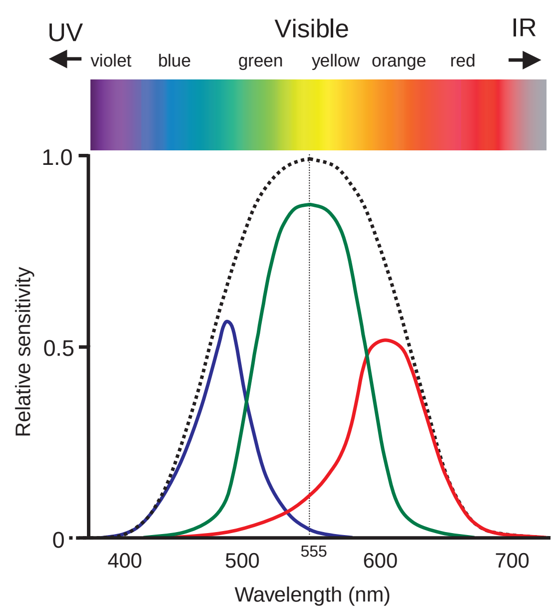


Fig. 2 Wavelength of visible light and sensitivity of human eye.

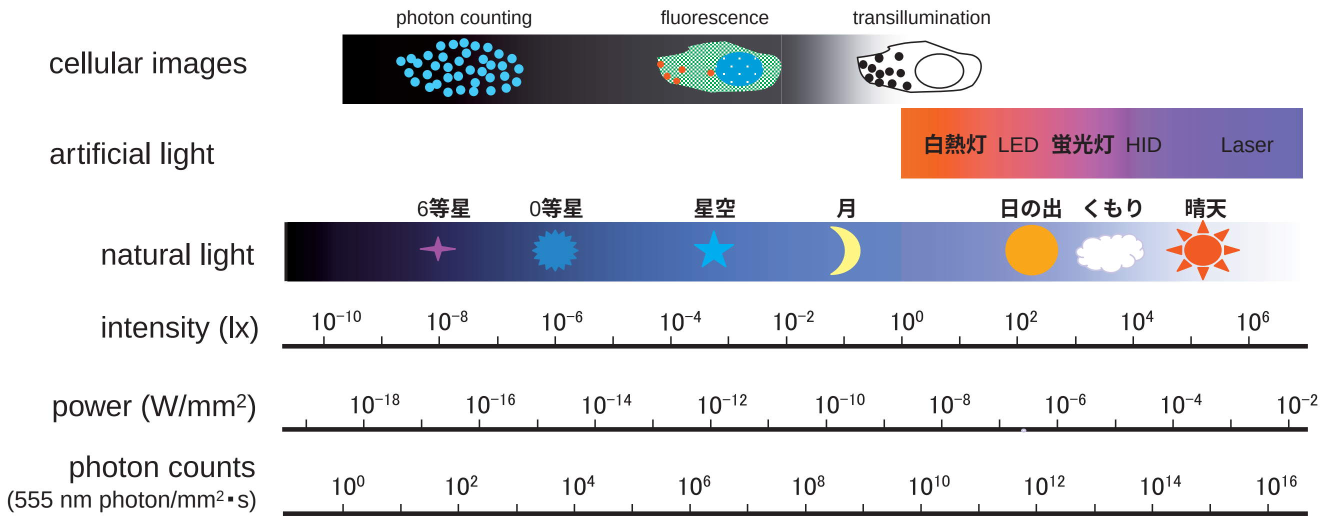


Fig. 3 Schematic diagram of relationship between light source and photonic level.

2.2　可視光線

可視光線とはヒトが色として知覚できる波長の範囲とされる。日本工業規格光学用語（JIS Z8120）によると、可視光線に相当する電磁波の波長は、短波長側360 nm～400 nm、長波長側760 nm～830 nmである。可視領域の光をプリズム（prism）に入射すると、虹のように（赤橙黄緑青藍紫の順番に）分かれる（Fig. 2)。1702年Newtonは、このように分解された光を亡霊という意味のspectorからスペクトル（spectrum）と付けた。スペクトルは元素の種類によって異なる。また肉眼で見えるスペクトルは生物種によって差がある。

2.3　いろいろな光源

光源には自然光源と人工光源があり、明るさで分類すると概ねFig. 3のようになる。

2.3.1　自然光源・化学発光

自然光源には、太陽や星などがある。これらの光は、光源の近くでは全ての方向に発散しているが、はるか遠方にある地球上では平行光（無限遠光）と見なされる。生物発光（bioluminescence）も自然光源の1つとされ、例えばウミホタルのルシフェリン（luciferin）の化学発光（chemiluminescence）がある。Fig. 4に示すとおり、タケノコも光を放つ[1)]。中野らはタケノコの発光は成長に依存して発生するチロシンラジカルによるものとし，“竹取の翁が見た光”という説話はまったくの作り話ではないようだ。光の粒を検出する技術（photon counting）を応用することでATPや活性酸素などの発生パターンの解析ができる[2, 3)]。

2.3.2　人工光源

ロウソクや行灯が古くからあり、Leeuwenhoekは17世紀に顕微鏡光源として採用していたとされる。19世紀Edisonにより白熱灯が発明され、現代ではランプ（lamp）とレーザー（light amplification by simulated emission of radiation, laser）が人工光源の代表である。ランプ光源はフィラメント型と放電型があり、金属やガスの種類に依存して複数の輝線（bright line）を出し、白色光（white light）と呼ばれている。ランプ光はバラバラな波の集まりであり、それぞれの波はランダムな方向に進む。これに対して、レーザー光は、単色であり、波がそろっており（干渉しやすいため可干渉性coherentとよばれる）、同じ方向に進行する。レーザー光はレンズ（lens）による集光性がすぐれ、エネルギーの集中がしやすい。

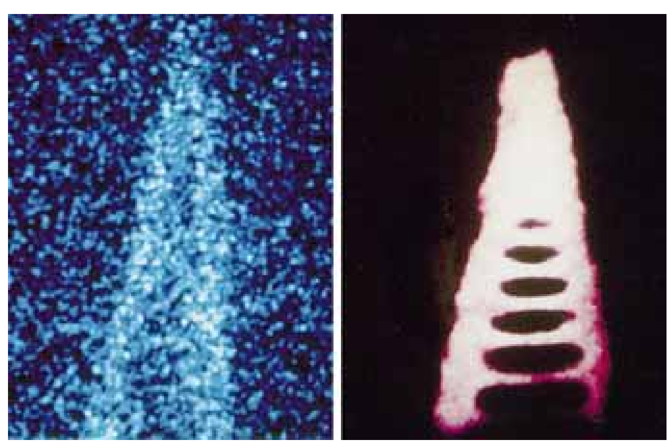


Fig. 4 Chemiluminescence from bamboo shoot cut. Each spot reflects a single photon derived from excited tyrosine.

2.3.3　明るさ

ランプの明るさを示す単位は光束（ルーメン , lm）が用いられる。ルーメンは光源の明るさを表すのに対し、ある地点での明るさは照度（ルクス , lx)で表され、1 lx=1 lm/m^2 の関係がある。パワーに換算すると１ルクスは約1/683（W/m^2）になる。人工光源の明るさをおおざっぱに比較すると、Edisonが発明した白熱灯の明るさを１とすれば、蛍光灯やLED（light emitting diode）が50前後、高圧水銀灯やキセノン灯などのHID（High intensity discharge lamp）が100程度、レーザーが100以上となる。光学顕微鏡では①高輝度（特定の輝線にピークがある）で、②輝度変化率が小さく、③光の発生点が単一で、④寿命の長い光源が有効である。

3．視覚と色

色は生理学的には視覚を通じて、形や距離などの空間的性質と混在して認識される。物理学的には視界中の対象とそれを照らす光の相性できまる。相性に関係する主要因子としては反射（reflection）・吸収（absorption）・透過（transmission）などがある。

3.1　視覚とは

ヒトの眼の網膜（retina）には、明暗を感じる桿体細胞（rod cell）と波長を見分ける錐体細胞（cone cell）がある。前者は高感度モノクロカメラ、後者は低感度カラーカメラと似た働きをもつ。ヒト錐体細胞には赤・緑・青それぞれの波長に感度をもつ細胞が存在していて[4)]、細胞から出た信号が刺激として脳に伝わり、興奮が統合されて色として感じる（Fig. 2)。生物種によって錐体細胞の分布や感度が異なるため、見える色の帯域には差がある。その例として、多くの昆虫類では見える領域がヒトよりも短波長側にシフトしているとされており、紫外光の識別ができる代わりに赤系の色が認識できない。ナトリウム灯が街灯として採用されているのは、ほとんどの昆虫類にはオレンジ系色が見えないからである。逆に通常ではヒトには見えない物体もある。蝶の羽根や花を紫外領域色で見ると、肉眼で見えたものと比べてまったく異なる模様となっている。

3.2　葉の色は何故緑なのか？

植物の葉緑素に存在するクロロフィル系色素は、赤と青を吸収し、緑の光を反射する。すなわち、可視光線の中で緑域が多く反射されるので、葉は緑色に見える。トマトやピンクグレープフルーツが赤く見えるのもこれと同じ理由で、リコピンというカロテノイド系色素が、赤帯域の波長を特に反射するからである。ついでに触れると、カエデが紅葉時に赤色や黄色に変化するのは、老化によってクロロフィルが分解されて、その分解産物から合成されたアントシアン系色素が赤や黄色を反射するからである。以上の例からわかるように、物体に光があたると反射や吸収がおこり、我々は反射して目に届いたスペクトル分布から色を知覚している（Young & Holmheltz, 1852年）。可視領域における全帯域の光が一様に反射されると白に見え、一方、全帯域において吸収される場合は黒と判断される。さらに蛍光灯の光の下で見た色と太陽の光の下で見た色が違うように、照明により物の色の見え方が変化することを演色（color rendering）といい、第４項の蛍光（fluorescence）と区別される。

3.3　顕微鏡の分解能とは

光は波長よりも大きな粒子と衝突すると反射するが、波長より十分小さいものではあまり反射しない。これは海における波と岩の関係と似ている。すなわち、波が大きな岩とぶつかると白波が見えるが、小さな岩との間では白波が発生しない。顕微鏡における像形成にはこの白波発生と同じ原理が利用されていて、標本と衝突する光の波長が空間分解能（spatial resolution）を決める重要な因子である(Fig. 1)。光学顕微鏡（optical microscope）では可視光線が用いられるので、約400 nmより大きな対象なら簡単に見ることができる。単一のオルガネラなど波長より小さな構造物の像は通常の観察法では不明瞭となるが、コントラスト強調観察法（contrast-enhanced microscopy）とよばれる位相差顕微鏡（phase contrast microscope）や微分干渉顕微鏡（differential interference contrast microscope）では光の諸性質（偏光や干渉など）を利用して像の改善が施されている。

4．蛍光

蛍光灯から蛍光塗料を除けば、ただの殺菌灯であることをご存知か？蛍光管の内側にある塗料が波長254 nm紫外光を吸収し、出てくる光が室内照明用として利用されている。このように色素類に光が吸収されて放たれる光（emitted light）のことを一般に蛍光とよび、色素類に照射する光のことを励起光（excitation light）とよぶ。発光の機構はヤブロンスキー図（Jablonski diagram）で説明されていて、励起された色素は化学的に不安定な状態（励起状態または一重項状態）となり、光や熱を放って元の状態（基底状態）に戻る[5)]。蛍光には次に示すいくつかの性質がある。

①蛍光波長は励起光よりも長くなる（ストークスシフト , stokes-shift）
②蛍光強度は励起光強度よりも弱くなる（約10^{-3}～10^{-6}倍）
③蛍光寿命（fluorescence life time）は約10^{-4}秒以下である

①は光がもつエネルギー（→５項）と関係がある。

②は光と色素の相性（量子効率 , quantum yield）と関係がある。テトラメチルローダミン（tetramethylrhodamine）は量子効率が高いとされており強い蛍光を放つため、希薄な（10^{-12} M）溶液にエバネッセント波[6)]（evanescent wave）を励起光として用いると、１個の分子から放たれた蛍光が単一輝点（spot）として観察できる[7)]（Fig. 5)。このように量子効率が一定値以上高い蛍光分子を限定領域（< 10^{-7} m）で励起すると蛍光分子像が見える。分子に複数個の光子を衝突させて蛍光を出させることを多光子励起法[8)]（multi-photon excitation）といい、量子効率は低いが解像力が上がる。

③の蛍光寿命とは、蛍光強度が１／eに低下するのに要する時間と定義され、フルオロセイン（fluorescein）の場合は10^{-9}秒である[9, 10)]。蛍光寿命は分子構造や特性、分子の置かれている状態に依存しており、蛍光エネルギー移動（fluorescence resonance energy transfer, FRET）の効率とも密接な関係がある[11)]。寿命が10^{-4}秒より長い光はりん光（phosphorescence）とよばれ、蛍光とおおまかに区別されている。りん光は三重状態からの発光であり、蓄光塗料などで利用されている。

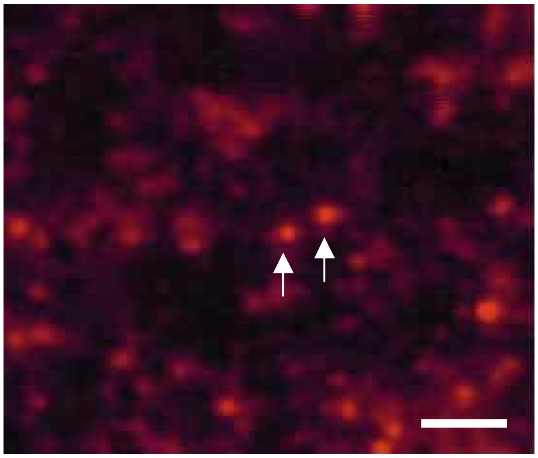


Fig. 5 Fluorescence images of a single tetramethylrhodamine molecule (i.e. arrows) by TIRF microscopy. Bar, 1 μm.

5．光のエネルギーと散乱

5.1　日焼けがおきるわけ

肌を太陽に暴露すると日焼けがおこる。これに対して、コタツでは熱を感じても日焼けはおきない。熱を感じるのはコタツから発せられた赤外線が水に吸収されるからである。日焼けは光のエネルギーや生体反応と関係がある。プランク係数を用いた数式によれば、光エネルギーのレベルは波長の長さに反比例しており、紫外線のほうが赤外線よりエネルギーが高い。細胞へ強い紫外線を照射すると、細胞膜やDNAの断裂が惹起される[12)]。また細胞には紫外線を吸収する色素類や酵素類が存在していて、一部では紫外線との反応により活性酸素が発生して生理機能に影響をあたえる。このような理由で赤外線と紫外線では生体への影響に差があり、傷害性の強い紫外線から組織を守るためにメラニン色素が増えて、肌が黒くなるわけである。日焼けとは光の粒と物体が衝突しておこる現象の１つであり、類似したものに写真（photography）や光電効果（photoelectric effect）やコンプトン効果（compton effect）がある。

5.2　空は何故青いのか？

太陽の光が地球に近づくと、窒素や酸素など大気の分子に衝突する。この衝突がおきたとき、大気分子の大きさは可視光の波長よりも小さいので反射はおきない。衝突した粒子が波長より小さいときは、レイリー散乱（rayleigh scattering）とよばれる現象がおきる[13)]。レイリー散乱の度合は波長の４乗に反比例し、赤い光よりも波長が2倍短い青い光は約16倍散乱するので、ヒトには空が青く見えるわけである（実際は紫が最も多く散乱されているので、昆虫類には空が紫色に見えているはず）。太陽光が地表に近づくと水滴と衝突するようになる。水滴の直径は光の波長と同程度なのでレイリー散乱にはならず、ミー散乱や非選択的散乱がおこる。こうした散乱の度合いは光の波長に依存せず、目に届くスペクトルが一様となるため、雲や霧が白く見えるのである。雲や霧が不明瞭な像であるように、散乱光の発生は顕微像がボケる原因の１つとなる。

6．屈折・干渉・回折

6.1　プリズムで色が分かれるわけ

光の進行速度は真空中では秒速30万kmだが、この速度は進行する媒質（誘電体）で変化する。水中では秒速22.5万km、ダイアモンドの中では半分以下の秒速12.5万kmとなる。媒質中と真空中での光の速さの比は屈折率（refractive index）と定義され、水の屈折率は1.33、ダイアモンドは2.4である。屈折率差のある媒質間を光が進行すると、媒質の境界（界面）で屈折（reflection）する。屈折により曲げられる角度（偏角）はスネルの法則（snell’s low）として定義されており、レンズや光ファイバーの理解には必須の法則である。屈折率は波長によっても変化し、これを分散（dispersion）と呼ぶ。波長の短い光の方が波長の長い光よりも速度が遅いので、その速度の差（分散率またはアッベ数）に応じて進む方向を変え、プリズムで見られるような分光がおこる。

6.2　タマムシ色とは？

第３項で、肉眼で知覚できる色は波長と反射の性質で大部分が説明できるとしたが、実はもうひとつ構造色（structural color）と呼ばれるものがある。これは干渉色ともよばれており、散乱や屈折に加えて干渉（interference）や回折（diffraction）により発生している。光の干渉はヤングの実験が有名であり、身近な例はシャボン玉（薄膜干渉）や二枚の薄ガラスを密着させたときに発生するニュートンリング（屈折と干渉）である。蛍光フィルターの反射防止膜は薄膜干渉における光の相殺性が利用されている。構造色は俗にタマムシ色と呼ばれる金属のような光沢をもって見え[14)]、コンパクトディスク（CD）の表面にも見られる。CDなどの光ディスク表面が虹色に見えるのは回折が波長に依存しているからである。ホログラフィー（holography）技術は紙幣の真偽判別等など幅広く利用されている[15, 16)]。

おわりに

今回は観察対象が色成す諸成因について、光の様々な性質が関係していることを知ってもらえたと思う。ところが「目でモノが見える理由」の説明はまだ半ばである。物体の色や明暗を感じることはできても、ピント（オランダ語punt由来の外来語・講談社日本語大辞典より）が合わないと像はボケて測定の精度が落ちる。次回はピント合わせに必須とされるレンズの基礎と活用法について解説する。

参考文献

1) H. Totsune, M. Nakano, H. Inaba, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **194**, 1025 (1993).
2) R. Creton, L. F.Jaffe, *Biotechniques,* **31**, 1098, (2001).
3) M. Masuko, S. Hosoi, T. Hayakawa, *FEMS Microbiol. Lett.*, **67**, 231 (1991).
4) I. Abramov, J. Gordon, *J. Opt. Soc. Am.,* **67**, 195 (1977).
5) P. B. Garland, G. H. Moore, *Biochem J.,* **183**, 561 (1979).
6) D. Axelrod, *Methods Enzymol.*, **361**, 1 (2003).
7) **寺川進ほか** , **生体の科学** , **54**, 245 (2003).
8) K. Konig, *J. Microsc.*, **200**, 83 (2000).
9) J. R. Lakowicz, H. Szmacinski, K. Nowaczyk, K. W. Berndt, M. Johnson, *Anal. Biochem.,* **202**, 316 (1992).
10) F. Schapper, J. T. Goncalves, M. Oheim, *Eur. Biophys. J.,* **32**, 635 (2003).
11) R. R. Duncan, A. Bergmann A, M. A. Cousin, D. K. Apps, M. J. Shipston, *J. Microsc.,* **215**, 1 (2004).
12) Free radicals in biology and medicine, 2nd ed., Oxford Press (1988).
13) C. Schulze, U. Kleuker, *J. Synchrotron Radiat.,* **5**, 1085 (1998).
14) D. J. Brink, N. G. van der Berg, A. J. Botha, *Appl. Opt.,* **41**, 717 (2002).
15) Z. Shi, J. J. He, S. He, *J. Opt. Soc. Am. A Opt. Image Sci. Vis.,* **21**, 1198 (2004).
16) J. Swoger, M. Martinez-Corral, J. Huisken, E. H. Stelzer, *J. Opt. Soc. Am. A Opt. Image Sci. Vis.,* **9**, 1910 (2002).

光学用語につき参照した Web サイト

http://www.nikonusa.com/　**ニコン**
http://microscope.olympus.com/　**オリンパス**
http://www.zeiss.com/　**カールツァイス**
http://www.optronics.co.jp/lex/　**オプトロニクス**
http://www.joem.or.jp/jis_maegaki.htm
日本オプトメカトロニクス協会

お知らせ

MSDS ダウンロードページオープン

皆様よりご要望の多かったMSDSのページをオープンいたしました。Home Page からダウンロードしてご覧頂けます。ご利用をお待ちしております。
http://www.dojindo.co.jp/msds/index.html



秋から冬の学会展示ご案内

次の学会において、試薬新製品の展示を行います。
皆様のお越しをお待ちいたしております。

- **日本生化学会第 77 回大会**
  10 月 14 日（木）～ 16 日（土）　**パシフィコ横浜**
- **第 27 回日本分子生物学会年会**
  12 月　8 日（水）～ 11 日（土）　**神戸国際展示場**

Topics on Chemistry

タンパク質の *In Vivo* 標識

同仁化学研究所　佐々本　一美

タンパク質の細胞内での機能や局在を調べるには、そのタンパク質を検出するための標識が必要になる。特に、共焦点レーザー顕微鏡などの装置の発達で、ケイ光標識したタンパク質の生きた細胞内での3次元の動きを可視化することも現在では可能である。

問題は如何に標識するかだが、最近よく用いられるGFPはアミノ酸238個と標識体としては大きすぎ、元々のタンパク質の機能に影響を与える恐れがある。目的とするタンパク質の性質をなるべく変えないためには低分子による標識が望ましいが、そのためには、タンパク質を *in vitro* で化学的に標識し、元の細胞に戻さなければならず[1]、特異的な細胞内での標識法（*in vivo* labeling）が望まれている。

In vivo labelingでは、標識体はまず細胞膜を通過し細胞内に進入し、無数に存在する生体分子とは相互作用せず、目的のタンパク質分子のみと結合しなければならず、高い親和性（nmol/l レベルの解離定数 K_d）と特異性が要求される。このような高い親和性（低い K_d 値）を持つタンパク質とリガンドの組み合わせとしては例えば、抗原 - 抗体の系、ビオチン - アビジン系、グルタチオン - GST系、メトトレキセート -DHFR系、バンコマイシン-^{D}Ala^{D}Ala系などがある。なかでもビオチン-アビジン系は最も代表的であるが（K_d ~ fmol/l）、グルタチオン同様、細胞には内因性のビオチンが存在するため、この系は現実的ではない。人工的なリガンドで、生体系と全く相互作用しないbio-orthogonalな系が望ましい。

Tsien ら[2]の報告した FlAsH は、目的のタンパク質にリガンド認識部位としてペプチド配列-CCXXCC-（Xはシステイン以外の任意のアミノ酸）を遺伝子工学的に導入し、リガンドである 2 個のヒ素を含むフルオレッセイン色素FlAsHがこの部分を特異的に認識するもので（K_d < 10 pmol/l）、結合によってリガンドのケイ光強度は50,000倍増加する。しかしこの場合は、内因性ジチオール類との非特異的な結合を避けるため、mmol/lオーダーのエタンジチオールなどを使用する必要がある。

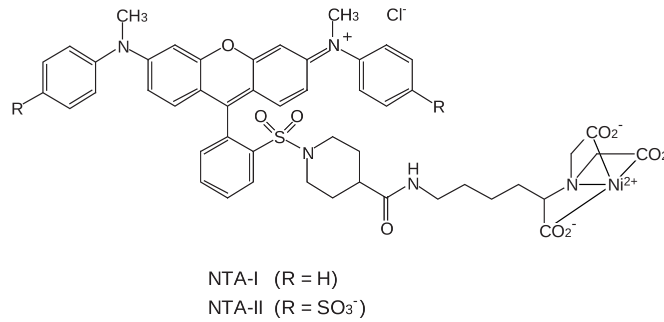


Fig. 1 NTA プローブ

これに対して、発現タンパク質マーカーとして汎用されているHis-Tagをリガンド認識部位として利用したGuignetら[3]の報告がある。NTA プローブ（Fig. 1）は、His-Tag と結合する NTA 部分とケイ光消光性のローダミン色素とから成っている。彼らは、セロトニンレセプターである 5HT$_3$ の異なる 3 つの部位にそれぞれ His$_6$ を導入し、細胞膜透過性の NTA-I を用いて、このレセプターの構造や膜上での分布について解析している。His-Tag との結合はキレート生成なので非常に早く（秒単位）、かつ可逆的であり、タンパク質の生きた細胞内での構造や局在を解析する有力な研究

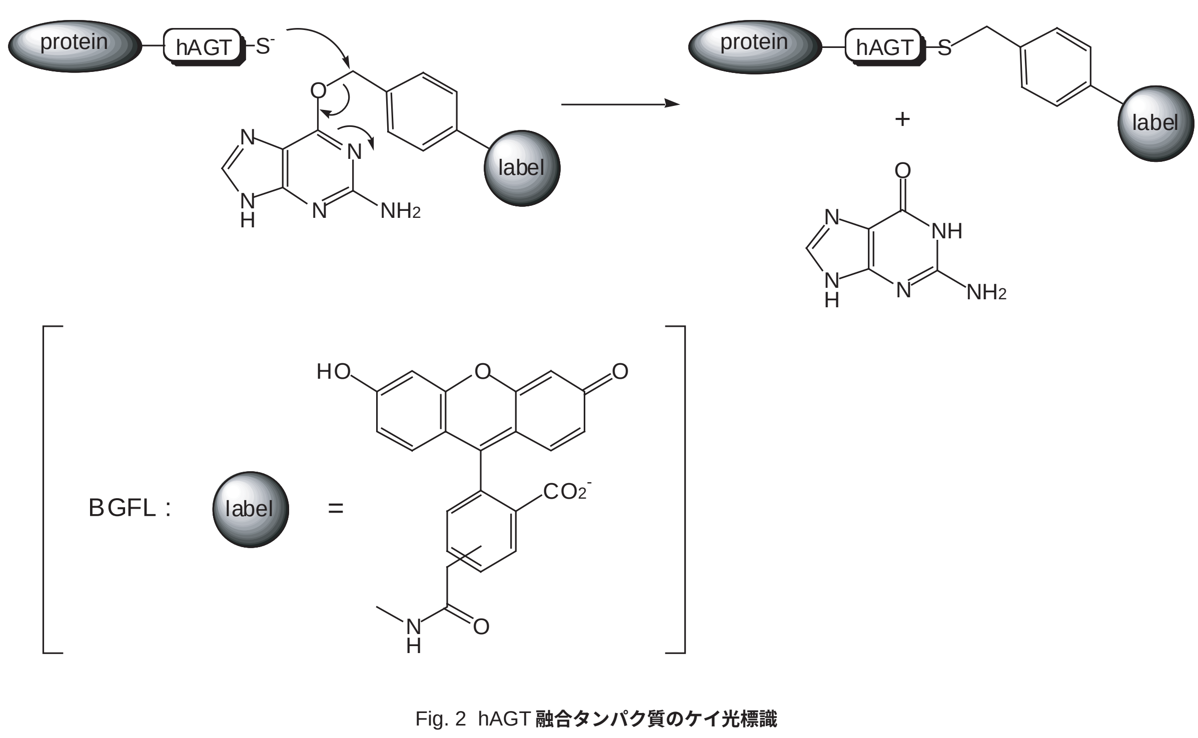


Fig. 2 hAGT 融合タンパク質のケイ光標識

手段となりえる。ただし、His_6 との親和性は 1~10 μmol/l 程度と若干低く特異性に欠けるため、His_{10} を導入することで親和性を向上させている（~0.2 μmol/l)。

FlAsHにおける非常に高い親和性はペプチドモチーフ中のシステインチオール基の空間的な配置が、リガンドのヒ素への配位にとってエントロピー的に非常に有利なためである。この様なケミカルな系（非共有結合型）と異なり、酵素と基質の組合わせによる共有結合型も報告されている[4)]。ヒトのDNA修復酵素である O^6-alkylguanine-DNA alkyltransferase（hAGT）は、O^6- アルキルグアニンを基質とし、6位アルキル基を自身のチオール基に転移させる（Fig. 2)。この反応を利用すればhAGTをタンパク質に導入し、種々のケイ光性の O^6- アルキルグアニン誘導体を基質としたタンパク質のケイ光標識が可能である。最近の Keppler ら[5)]の論文では、この技術を利用したマルチカラーの解析も報告されている。この場合には内因性の hAGT が問題となるため、実験には hAGT 欠損細胞を用いなければならない点が最大の弱点だと思われる。

この他、生物学的なアプローチとして、inteinのスプライシングに基づく *in vivo* labeling も数多く報告されてきており[6,7)]、今後の進展が期待される分野である。

文献及びノート

1) タンパク質の翻訳段階で導入する技術として、amber suppressor tRNA による標識（Mendel, D., Cornish, V. W. and Schultz, P. G., *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **24**, 435（1995））やピューロマイシンを用いるC端標識法（Nemoto, N., Miyamoto-Sato, E. and Yanagawa, H., *FEBS Lett.*, **462**, 43（1999））がある。
2) Griffin, B. A., Adams, S. R. and Tsien, R. Y., Specific Covalent Labeling of Recombinant Protein Molecules Inside Live Cells. *Science*, **281**, 269 (1998).
3) Guignet, E. G., Hovius, R. and Vogel, H., Reversible Site-selective Labeling of Membrane Proteins in Live Cells. *Nat. Biotechol.*, **22**, 440 (2004).
4) Keppler, A., Gendreizig, S., Gronemeyer, T., Pick, H., Vogel, H. and Johnsson, K., A General Method for the Covalent Labeling of Fusion Proteins with Small Molecules *In Vivo. Nat. Biotechnol.*, **21**, 86, (2003).
5) Keppler, A., Pick, H., Arrivoli, C., Vogel, H. and Johnsson, K., Labeling of Fusion Proteins with Synthetic Fluorophores in Live Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **101**, 9955 (2004).
6) Giriat, I. and Muir, T. W., Protein Semi-Synthesis in Living Cells. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 7180 (2003).
7) Yeo, D. S, Srinivasan, R., Uttamchandani, M., Chen, G. Y, Zhu, Q. and Yao, S. Q., Cell-permeable Small Molecule Probes for Site-specific Labeling of Proteins. *Chem. Commun.*, 2870 (2003).

お知らせ

遺伝子損傷検出キット仕様変更

-Nucleostain- DNA Damage Quantification Kit -AP Site Counting-

-Nucleostain- DNA Damage Quantification Kit -AP Site Counting- は、酸化ストレスなどの傷害により生じる DNA 損傷部位(AP site)数を測定するキットとしてご好評頂いております。このたびキットの酵素の安定性をより高めるために、キットに含まれる HRP-streptavidin について容量変更および関連して使用方法を以下の通り変更いたしました。

変更箇所については、キット添付の取扱い説明書で網かけ表示をしておりますので、よくご確認の上、ご使用くださいますようお願い申し上げます。尚、詳細については、下記アドレスをご覧ください。
http://www.dojindo.co.jp/backnumber/news/ddqk.html

容量

HRP-streptavidin　従来：500 μl × 1　==>　新：25 μl × 1

取扱説明書の使用方法

III 操作方法　2. AP site 数の検出……5)

旧：また HRP-streptavidin 400 μl を洗浄用 PBST 19.6 ml で 50 倍に希釈して希釈 HRP-streptavidin を調製する（用時調製)。

新：HRP-streptavidin を洗浄用 PBST で 4,000 倍に希釈し、希釈 HRP-streptavidin を調製する（例 HRP-streptavidin 10 μl +PBST 40 ml)。

IV 注意事項……7.

旧：添付の HRP-streptavidin は安定性を向上させ、かつ取り扱いやすいように希釈したタイプとしました。希釈率が以前のものと異なっておりますのでご注意下さい。なお、得られる結果に影響はございません。

新：記載なし

トラブルシューティング

A. 発色しないあるいは発色が極端に少ない……2)

旧：1/50 に希釈した HRP-streptavidin 溶液を使用しましたか。

新：1/4,000 に希釈した HRP-streptavidin 溶液を使用しましたか。

C. 全ての well の発色が強すぎる……1)

旧：HRP-streptavidin 溶液は、洗浄用 PBST で 1/50 に希釈しましたか。

新：HRP-streptavidin 溶液は、洗浄用 PBST で 1/4,000 に希釈しましたか。

品名	容量	本体価格（¥）	メーカーコード
-Nucleostain- DNA Damage Quantification Kit -AP Site Counting-			
	5 samples	22,000	DK02
	20 samples	69,000	DK02

新製品

アルカリホスファターゼ標識用キット

Alkaline Phosphatase(ALP)は、その基質特異性を利用し、Peroxidase と同様、免疫染色法や Enzyme Linked Immunosorbent assay(ELISA)に汎用されています。ALP 標識体は、過ヨウ素酸、グルタルアルデヒドまたは二官能性架橋剤を用い作製されますが、その合成操作は煩雑であり、且つクロマトグラフィーや透析のような手間のかかる精製が必要です。

Alkaline Phosphatase Labeling Kits は、アミノ基あるいはSH基を有する分子にALPを標識するためのキットで、キット付属のReactive ALPと標的分子を混合するだけで簡単にALP標識体を得ることができます。イムノグロブリンG (IgG)にALPを標識する場合、必要なIgGの量は50～200 μgで、少量の標識体を調製するのに最適です。IgGだけではなく、Fab'への標識も可能です。また、IgGのような高分子タンパクだけでなく、低分子化合物への標識も可能であり、広範な標識用途に利用できます。

Alkaline Phosphatase Labeling Kit-NH_2

＜特長＞
- 3時間以内にアルカリホスファターゼ標識体が調製できる。
- 高分子化合物（MW>50,000）および低分子化合物（MW<5,000）を標識できる。
- NH_2-Reactive ALP と混合するだけでアルカリホスファターゼ標識体を形成する。
- Filtration Tube を用いた分離操作により高い回収率で標識体が得られる。
- 付属の保存溶液で ALP 標識体の長期保存ができる。

＜キット内容＞　3 サンプル標識用

NH_2-Reactive ALP	100 μg × 3 本
Washing Buffer	4 ml × 1 本
Reaction Buffer	200 μl × 1 本
Storage Buffer	4 ml × 1 本
Filtration Tube	3 本

Alkaline Phosphatase Labeling Kit-NH_2は、アミノ基を有する分子にALPを標識するためのキットです。NH_2-Reactive ALPは、活性エステル基を導入したALPです。アミノ基を有する標的分子と混合するだけで安定な共有結合を形成します。IgGのような高分子タンパクをサンプルに使用する場合、付属の Filtration Tube を用いて簡単にサンプルの前処理を行うことができます(Fig. 1)。ALP活性や標識反応を阻害するような低分子化合物（リン酸やトリスなど）は、Filtration Tube を用いた前処理によって除去されるため、透析やゲルろ過などの処理を行う必要がありません。また、本キットを用いて低分子化合物を標識する場合、未反応の低分子化合物は付属のFiltration Tubeを用いた精製操作により除去されるため、高純度の標識体を得ることができます。

本キットには標識に必要なすべての試薬と作製したALP標識体を保存するための溶液が含まれています。

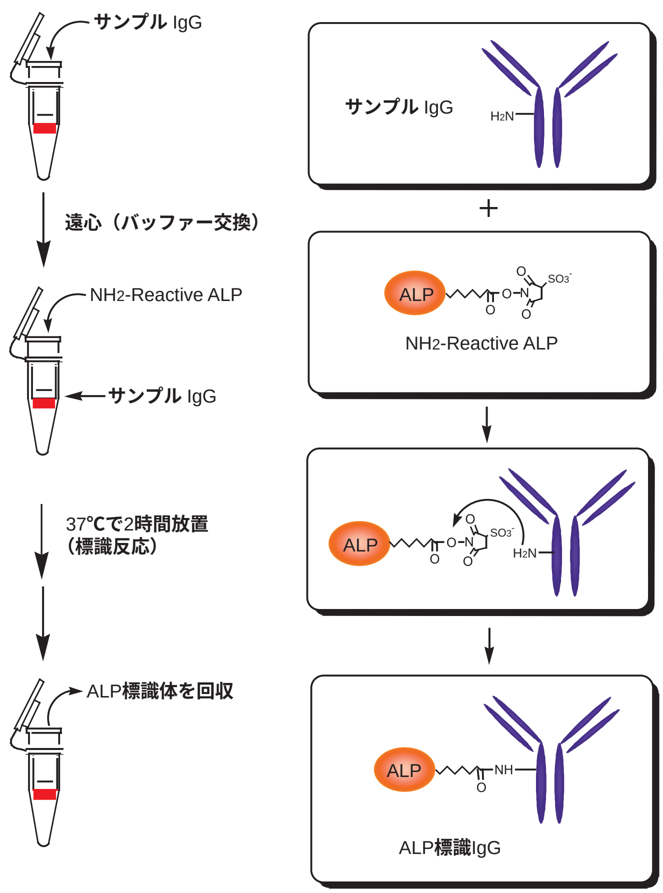


Fig. 1 ALP 標識 IgG の調製法

品名	容量	本体価格（¥）	メーカーコード
Alkaline Phosphatase Labeling Kit-NH_2	3 samples	21,000	LK12

Alkaline Phosphatase Labeling Kit-SH

＜特長＞
- 3 時間以内にアルカリホスファターゼ標識体が調製できる。
- 高分子化合物（MW>50,000）および低分子化合物（MW<5,000）を標識できる。
- SH-Reactive ALPと混合するだけでアルカリホスファターゼ標識体を形成する。
- 付属の還元剤を用いることで遊離SH基を持たないタンパク質への標識も可能 *。
- Filtration Tube を用いた分離操作により高い回収率で標識体が得られる。
- 付属の保存溶液で ALP 標識体の長期保存ができる。

* S-S 結合の切断によってタンパク質の活性が失われる場合があります。

＜キット内容＞　3 サンプル標識用

SH-Reactive ALP	100 µg × 3 本
Reducing Agent	80 µg × 3 本
Solution A	4 ml × 1 本
Solution B	1 ml × 1 本
Reaction Buffer	200 µl × 1 本
Storage Buffer	4 ml × 1 本
Filtration Tube	3 本

Alkaline Phosphatase Labeling Kit-SHは、SH基を有する分子に ALP を標識するためのキットです。SH-Reactive ALP は、マレイミド基を導入した ALP です。SH 基を有する標的分子と混合するだけで安定な共有結合を形成します。標的タンパク質がSH基を持っていない場合には、付属の還元剤を用いて遊離 SH 基を調製することが可能です（ただし、S-S 結合の切断によってタンパク質の活性が失われる場合があります）。IgG ヒンジ領域の SH 基を標識に利用すれば、抗体活性を損なわずにALPを標識することができます。

IgG のような高分子タンパクをサンプルに使用する場合、付属のFiltration Tubeを用いることで簡単にサンプルの前処理を行うことができます(Fig. 2)。ALP 活性を阻害するような低分子化合物（リン酸など）は、Filtration Tube を用いた前処理によって除去されるため、透析やゲルろ過などの処理を行う必要がありません。また、本キットを用いて低分子化合物を標識する場合、未反応の低分子化合物は付属のFiltration Tubeを用いた精製操作により除去されるため、高純度の標識体を得ることができます。

本キットには標識に必要なすべての試薬と作製したALP標識体を保存するための溶液が含まれています。

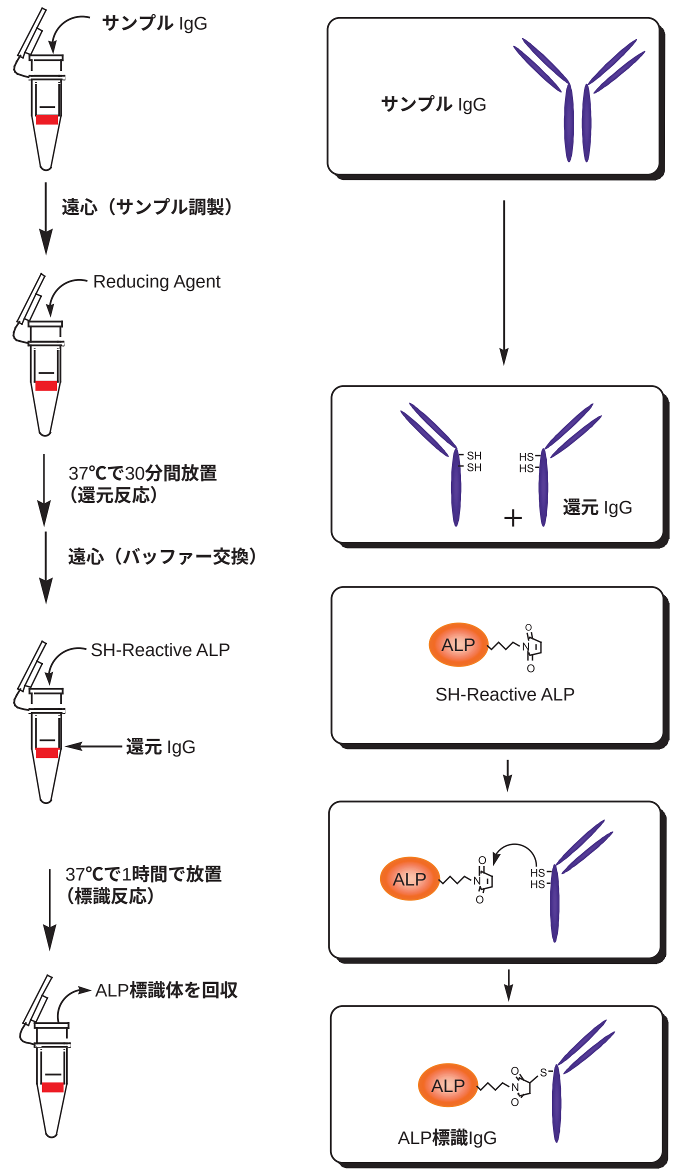


Fig. 2 ALP 標識還元 IgG の調製法

品名	容量	本体価格（¥）	メーカーコード
Alkaline Phosphatase Labeling Kit-SH	3 samples	21,000	LK13

Q & A

アルカリホスファターゼ標識用キット

Alkaline Phosphatase Labeling Kit-NH_2
Alkaline Phosphatase Labeling Kit-SH

前号でご紹介しました Peroxidase Labeling Kit と同様の注意点がございます。

Peroxidase, Alkaline Phosphatase ご使用の検出系にあった酵素をお選びください。

Q1 キットが2種類ありますが、どちらを選べばよいのでしょうか？

A1 化合物内にアミノ基を有するものはAlkaline Phosphatase Labeling Kit-NH_2 を、SH 基(もしくは S-S)を有するものは Alkaline Phosphatase Labeling Kit-SH をご使用ください。

Q2 IgG 以外のタンパク質にも標識することはできますか？

A2 分子量が50,000以上あるいは5,000以下のものでアミノ基もしくは反応性のチオール基を持っていれば標識できます。分子量 5,000 以下の化合物に関しては製品添付の‐低分子化合物への標識‐のプロトコールに従ってください。

Q3 使用できる IgG が少量しかないのですが標識できますか？

A3 使用できる IgG の量は 50 ～ 200 µg としています。この範囲であれば性能に大きな違いはみられません。
10 µgのIgGでも標識可能ですが、バックグラウンドの上昇などの問題が生じる可能性があります。

Q4 サンプルは溶液になっていても問題ないでしょうか？

A4 問題ありません。
但し、添付のFiltration Tubeの容量に制限がありますので、サンプル溶液の容量は 100 µl 以下である必要があります。
また、サンプル(IgG など)の濃度が 0.5 mg/ml 以下である場合は、Filtration Tube を用いてそのサンプル量が 50 ～ 200 µg となるようにします。
溶液を Filtration Tube にいれて遠心して溶液を除く操作を行ってください（必要であれば繰り返す)。
フィルター上に残っているサンプル量が 50 ～ 200 µg となればよいですから、改めて溶解させる必要はありません。

Q5 それぞれのキットのラベル化後の安定期間は？

A5 添付の Storage Buffer 中に保存した場合、最低 2ヶ月は安定です。ただし、安定性はラベル化する抗体によって異なります。

Q6 遠心が8,000 × *g*, 10 minとなっていますが、回転数がもっと少なくてもできますか？

A6 可能です。
ただし、回転数を落とすと長時間の遠心が必要になります。

Q7 SHラベルのキットはS-S基を含む低分子化合物に対しても使用できますか？

A7 残念ながら、このキットではできません。S-S 基を SH に還元するための Reducing Agent と低分子化合物の分離ができないためです。還元したものを別にご用意ください。

Q8 添付の保存バッファーでなくともラベル化物の保存はできますか？

A8 可能です。
実験系によりご希望のバッファーに溶解し保存してください。ただし、ラベル化後の安定性に関しては小社安定性データをそのまま利用することはできません。

Q9 Reactive ALP(NH_2,SH ともに)は buffer に溶解後、保存できますか？

A9 溶解後、すぐに使用する事をおすすめします。
Reactive ALPの反応基が分解するため、反応効率が低下すると思われます。

Q10 サンプルが buffer に溶解しない場合、DMSO を使用することになっていますが、他の有機溶媒ではダメですか？

A10 水溶性の有機溶媒であれば大丈夫です。
DMF やアルコールであればご使用いただけます。

Q11 IgG 1分子に対してどれくらいのAlkaline Phosphataseが標識されますか？

A11 NH_2 では IgG 1 分子に対して、SH では還元 IgG 1 分子に対して、平均1～2分子の Alkaline Phosphatase が標識されます。
未反応のAlkaline Phosphataseは通常のエンザイムイムノアッセイには影響を及ぼしません。希釈してご使用ください。
精製が必要な場合には、ゲルろ過カラムあるいは IgG のアフィニティーカラムにより精製を行ってください。

Q12 200 µg よりも多い量（mg 単位）のラベル化を行いたいのですが、このキットで出来ますか？

A12 このキットでは mg スケールのラベル化は困難です。
Peroxidase, Alkaline Phosphatase の 1 mg、10 mg 包装をご希望の方は、小社マーケティング部までご連絡ください。
＜連絡先＞

(株)同仁化学研究所　マーケティング部
Tel:0120-489548
Fax:0120-021557
E-mail:info@dojindo.co.jp

新製品

ビオチン標識用キット

Biotin Labeling Kit-NH_2

＜特長＞
- 2 時間以内にビオチン標識体が調製できる。
- NH_2-Reactive Biotinと混ぜるだけで、安定な共有結合を形成する。
- Filtration Tube を用いた分離操作により高い回収率で標識体が得られる。
- 付属の保存溶液でビオチン標識体の長期保存ができる。

＜キット内容＞　3 サンプル標識用

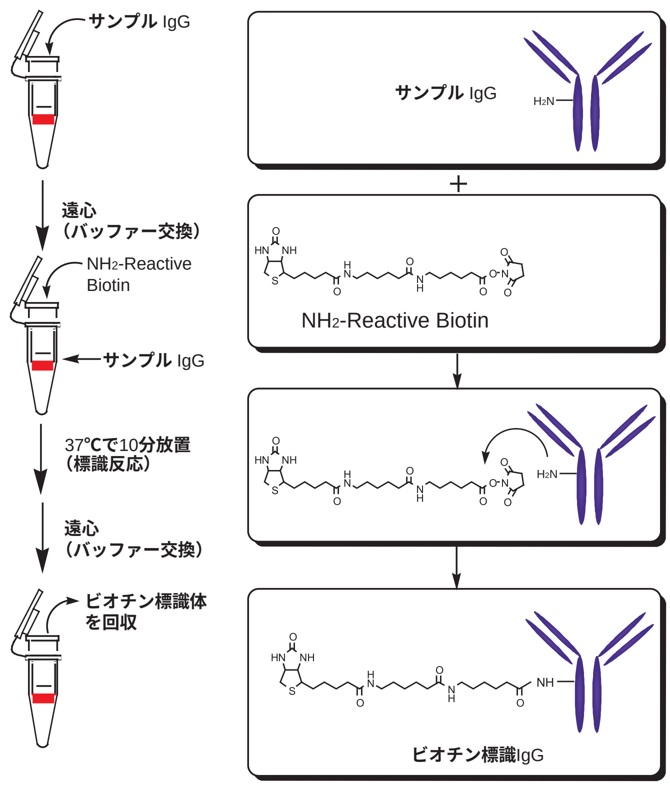
NH_2-Reactive Biotin	3 本
Reaction Buffer	0.5 ml x 1 本
WS Buffer	4 ml　x 1 本
Filtration Tube	3 本

Biotin Labeling Kit-NH_2 は、アミノ基を有するタンパク質（抗体）にビオチンを標識するためのキットです。キット付属の NH_2-Reactive Biotinは、その構造内に活性エステル基を有しているため、アミノ基を有する標的分子と混合するだけで安定な共有結合を形成します。イムノグロブリンG（IgG）にビオチンを標識する場合、付属のFiltration Tubeを用いて簡単にサンプルの前処理を行うことができます。標識反応を阻害するような低分子化合物（トリスなど）は前処理によって除去され、かつ未反応の NH_2-Reactive Biotinは反応後のFiltration Tubeを用いた精製操作により除去されるため、透析やゲルろ過などの処理を行う必要がなく、高純度の標識体を高い回収率で得ることができます。

1 回の標識操作に必要なタンパク量は 50～200 µg と少量であり、小社ビオチンラベル化キット「Biotinylation Kit(Sulfo-OSu)*」と比較して、より少量の標識体を調製するのに最適です。

本キットには標識に必要なすべての試薬と作製したビオチン標識体を保存するための溶液が含まれています。

* Biotinylation Kit(Sulfo-OSu)では、1 回の標識操作で 1～5 mg のタンパク質（抗体）のラベル化と精製が可能です。



ビオチン標識IgGの調製法

関連商品
Biotinylation Kit (Sulfo-OSu)

水溶性の活性エステルタイプのビオチン化試薬:Biotin-$(AC_5)_2$ Sulfo-OSuを用いた、タンパク質の遊離のアミノ基をビオチンラベル化するキットです。ラベル化用の$NaHCO_3$緩衝液用粉末、ゲルろ過用カラムおよびカラム溶離用PBS錠剤を付属しており、ラベル化したタンパクを精製できます。1 ショットタイプ（10 mg × 4 本）なので、それぞれ異なった 4 種類のタンパクのラベル化が可能です。Biotin-$(AC_5)_2$ Sulfo-OSu の添加量を変えることで、ラベル化率のコントロールが可能です。

＜キット内容＞

・Biotin-$(AC_5)_2$ Sulfo-OSu	10 mg × 4 本
・$NaHCO_3$ 緩衝液用粉末	4 本
・PBS 錠剤	4 錠
・ゲルろ過用カラム	4 本
・サンプルチューブ	8 本

品名	容量	本体価格（¥）	メーカーコード
Biotin Labeling Kit-NH_2			
	3 samples	12,000	LK03

品名	容量	本体価格（¥）	メーカーコード
Biotinylation Kit (Sulfo-OSu)			
	set	35,800	BK01

試作品

ビオチン標識用キット

Biotin Labeling Kit-SH

＜特長＞
- 3 時間以内にビオチン標識体が調製できる。
- SH-Reactive Biotin と混ぜるだけで、安定な共有結合を形成する。
- 付属の還元剤を用いることで、遊離SH基を持たないタンパク質への標識も可能である *。
- Filtration Tube を用いた分離操作により高い回収率で標識体が得られる。
- 付属の保存溶液でビオチン標識体の長期保存ができる。

* S-S 結合の切断によって、タンパク質の活性が失われる場合があります。

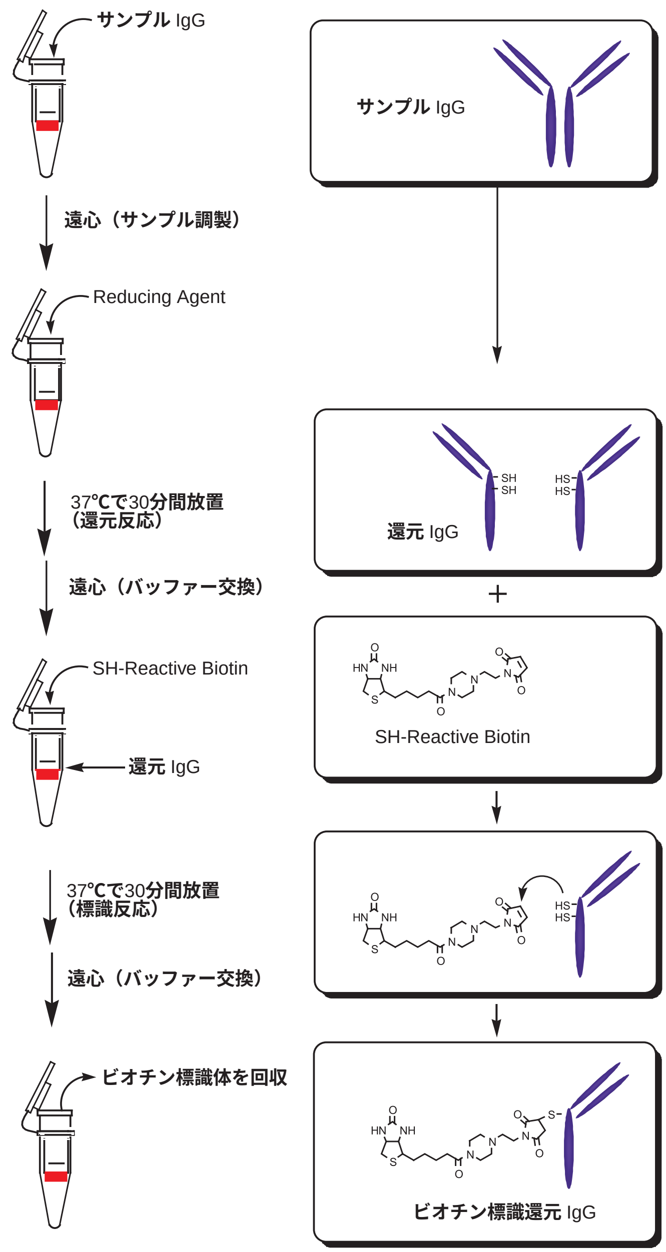
＜キット内容＞　3 サンプル標識用

SH-Reactive Biotin	3 本
Reducing Agent	3 本
Reaction Buffer	1 ml × 1 本
WS Buffer	4 ml × 1 本
Filtration Tube	3 本

　Biotin Labeling Kit-SH は、SH 基を有するタンパク質（抗体）にビオチンを標識するためのキットです。キット付属の SH-Reactive Biotin は、その構造内にマレイミド基を有しているため、SH基を有する標的分子と混合するだけで安定な共有結合を形成します。標的タンパク質が S-S 結合を持つ場合には、付属の還元剤を用いて遊離 SH 基を調製することが可能です（ただし、S-S 結合の切断によってタンパク質の活性が失われる場合があります）。イムノグロブリン G（IgG）にビオチンを標識する場合、付属の Filtration Tubeを用いて簡単にサンプルの前処理を行うことができ、ヒンジ領域の SH 基を標識に利用すれば、抗体活性を損なわずにビオチン標識還元 IgG を調製することができます。また、未反応の SH-Reactive Biotin は反応後の Filtration Tube を用いた精製操作により除去されるため、透析やゲルろ過などの処理を行う必要がなく、高純度の標識体を高い回収率で得ることができます。

　1 回の標識操作に必要なタンパク量は 50 〜 200 µg と少量であり、少量の標識体を調製するのに最適です。

　本キットには標識に必要なすべての試薬と作製したビオチン標識体を保存するための溶液が含まれています。



ビオチン標識還元IgGの調製法

試作品

蛍光標識用キット

本製品はモノクローナル抗体などの少量のタンパク質を蛍光標識するためのキットです。本キットは、簡便な操作性、高い回収率、高い再現性などの特長を持っています。標識できるタンパク質量は50-200 µgで、1キットで3種類のタンパク質を標識することができます。わずか2時間で蛍光標識タンパク質を得ることができ、得られた標識体はそのまま免疫染色などの様々な用途に利用することができます。

Fluorescein Labeling Kit - NH_2

＜特長＞

- 約2時間で標識体が調製できる。
- Filtration Tubeを用いた分離操作により高い回収率で標識体が得られる。
- 付属の保存溶液で標識体の長期保存ができる。

＜キット内容＞

NH_2- Reactive Fluorescein	3本
WS Buffer	4 ml × 1本
Reaction Buffer	500 µl × 1本
Filtration Tube	3本

Oyster®-556 Labeling Kit - NH_2
Oyster®-656 Labeling Kit - NH_2

Oyster®-dyeは独Denovo biolabels社が開発した新しいシアニン系蛍光色素です。Cy dye等の既存のシアニン色素に比べ、蛍光量子収率が高く、光安定性が高くなっています。また、凝集や吸着なども起こりにくく、タンパク質のラベル化に適した蛍光色素です。

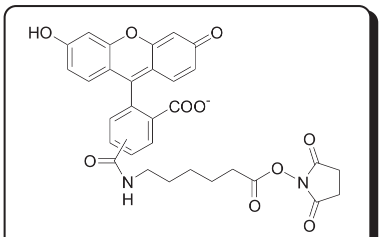
＜特長＞

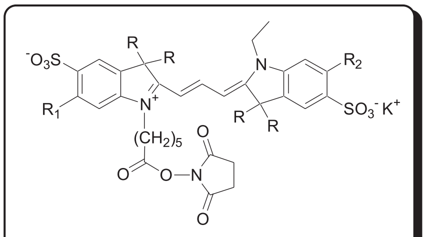
- 約2時間で標識体が調製できる。
- Filtration Tubeを用いた分離操作により高い回収率で標識体が得られる。
- 付属の保存溶液で標識体の長期保存ができる。
- 蛍光色素の蛍光量子収率が高い。
- 蛍光色素の光安定性が高い。
- 蛍光色素の凝集や吸着が起こりにくい。

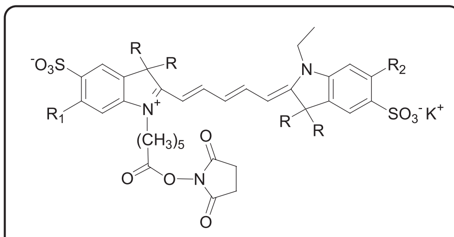
＜キット内容＞

NH_2- Reactive Oyster® dye*	3本
WS Buffer	4 ml × 1本
Reaction Buffer	500 µl × 1本
Filtration Tube	3本

* Oyster®-556dyeもしくはOyster®-656dyeが入っています。


Amine Reactive Fluorescein


Amine Reactive Oyster®-556


Amine Reactive Oyster®-656

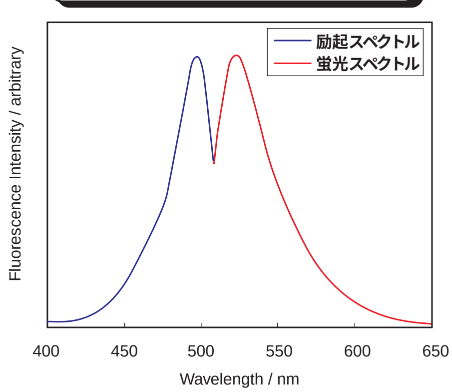


Fig. 1 Fluorescein Labeling Kit - NH_2を用いて作製した標識抗体の励起•蛍光スペクトル。

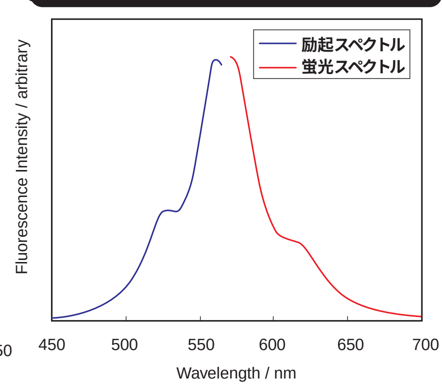


Fig. 2 Oyster®-556 Labeling Kit - NH_2を用いて作製した標識抗体の励起•蛍光スペクトル。

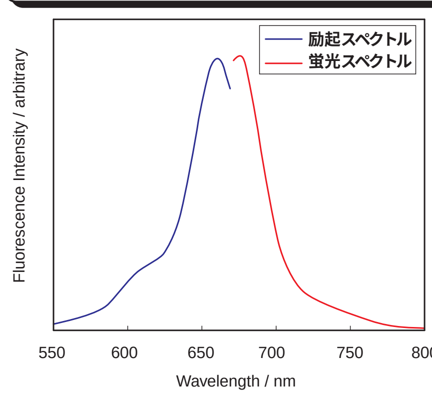


Fig. 3 Oyster®-656 Labeling Kit - NH_2を用いて作製した標識抗体の励起•蛍光スペクトル。

開催のご案内

15th フォーラム・イン・ドージン

ウイルスー飛び回る遺伝子ーの分子病理学

日　時／2004年11月26日（金）9:30-17:30（開場 9:00）
場　所／鶴屋ホール（テトリア熊本[鶴屋東館]7F・熊本市手取本町8－1）
代表世話人／山本 哲郎（熊本大学大学院医学薬学研究部 分子病理学分野）
当番世話人／原田 信志（熊本大学大学院医学薬学研究部 感染防御学分野）
主　催／株式会社 同仁化学研究所
後　援／株式会社 ケミカル同仁

参加費／無料
定員／300名

セッション1　＜座長：山本　哲郎＞

9:45-10:30　林　哲也　（宮崎大学フロンティア科学実験総合センター）
「原核細胞世界におけるファージの役割：菌種を越えたファージ進化と病原細菌の進化への関与」

10:30-11:15　原田 信志　（熊本大学大学院医学薬学研究部　感染防御学分野）
「ウイルスのリセプターへの吸着と感染の機構」

11:15-12:00　増田 貴夫　（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科　免疫治療学分野）
「ウイルスゲノムの宿主細胞染色体への組み込み機構」

セッション2　＜座長：松下　修三＞（熊本大学エイズ学研究センター病態制御分野）

13:15-14:00　岡本　尚　（名古屋市立大学大学院医学研究科　細胞分子生物学）
「宿主細胞におけるウイルス遺伝子の発現機構」

14:00-14:45　藤井 雅寛　（新潟大学大学院医歯学総合研究科　ウイルス学分野）
「HTLV-1による宿主細胞癌化機構」

14:45-15:30　櫻木 淳一　（大阪大学微生物病研究所　ウイルス感染制御分野）
「ウイルスゲノムパッケージング」

セッション3　＜座長：原田　信志＞

15:45-16:30　馬場 昌範　（鹿児島大学難治ウイルス病態制御研究センター）
「抗ウイルス化学療法における分子標的」

16:30-17:15　岩本 愛吉　（東京大学医科学研究所付属病院先端医療研究センター）
「日本人社会とウイルスの変化」

問い合わせ・申し込み先：
熊本県上益城郡益城町田原2025-5(株)同仁化学研究所内
フォーラム・イン・ドージン事務局（担当：蒲野・堀口）
Tel:0120-489548, Fax:0120-021557　E-mail:info@dojindo.co.jp

◎講演終了後、ミキサー（無料）を同開場にて予定しております。(17:45-19:30)
◎参加ご希望の方は、所属・氏名・連絡先(住所,TEL,FAX,E-mail)・ミキサー参加の有無をご記入の上、E-mailまたはFAXにてお申し込みください。
◎駐車場は有料となりますので、できるだけ公共の交通機関をご利用ください。

ホームページアドレス
URL : http:// www. dojindo.co.jp/
E-mail : info@dojindo.co.jp

フリーファックス　0120-021557
フリーダイヤル　0120-489548

DOJIN News No.112
ドージンニュース No.112　平成16年10月1日発行
株式会社同仁化学研究所　DOJINDO LABORATORIES
熊本県上益城郡益城町田原2025-5 〒861-2202
発行責任者 吉田睦男　編集責任者　斉藤素子　年4回発行　許可なくコピーを禁ず